



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΑΘΗΝΩΝ-ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ-
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ**

Υπεύθυνος καθηγητής: Λεωνίδας Στεφανής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

Διπλωματική Εργασία

Θέμα: Χρήση χημικών ουσιών που εμποδίζουν το σχηματισμό ολιγομερών της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συναουκλαΐνης. Επιπτώσεις στην κυτταροτοξικότητα.

Νικολάου Καλλιόπη
Ιατρός, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών-
Ειδικευόμενη Ψυχίατρος

Τριμελής Επιτροπή:

Λ. Στεφανής
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών Ιατρική Σχολή, Β' Νευρολογική Κλινική,
Αττικό Νοσοκομείο

Σ. Ευθυμίουπουλος
Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

Κ. Θερμού
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Κρήτης

Αθήνα, Φεβρουάριος 2009

Περιεχόμενα :

1. Περίληψη	3
1. Summary	4
2. Εισαγωγή	6
2.1. Νευροεκφυλιστικές νόσοι	6
2.2. Νόσος Πάρκινσον	6
2.2.1. Οικογενείς και σποραδικές μορφές της Νόσου Πάρκινσον- συσχέτιση με την α-συνουκλεΐνη	9
2.2.2. α-συνουκλεΐνη	12
2.2.2.1. Δομή, εντόπιση και φυσιολογική λειτουργία της α- συνουκλεΐνης	12
2.2.2.2. Εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη	14
2.2.2.3. Τοξικές μορφές α-συνουκλεΐνης-μηχανισμοί τοξικής δράσης-παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία συσσωματώσεων	16
2.2.2.4. Ανάπτυξη δυνητικά νευροπροστατευτικών θεραπειών με βάση την τροποποίηση της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης	23
2.2.2.5. Το Congo red και η δράση του στη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών νόσων	24
2.2.2.6. Η Chrysamine G και η χρήση της στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων	25
2.2.2.7. Ιδιότητες της scyllo-inositol και χρήση της στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων	25
3. Αντικειμενικοί σκοποί της εργασίας	26
3.1. Διερεύνηση της τοξικότητας της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	26
3.2. Χρήση των χημικών ουσιών Chrysamine G, Congo red, Scyllo- inositol και η επίδρασή τους στην τοξικότητα της εκκρινόμενης α- συνουκλεΐνης	27
4. Πειραματικές διαδικασίες-Υλικά και μέθοδοι	28
4.1. Κυτταρικές καλλιέργειες	28
4.2. Συλλογή θρεπτικού υλικού (CM)-Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων	29
4.3. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	30
4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός της α-συνουκλεΐνης	31
4.5. Μικροσκοπία	32
4.6. Μέτρηση κυτταροτοξικότητας	32
4.7. Επεξεργασία ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης για το σχηματισμό συσσωματωμάτων και χρήση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol	33
5. Αποτελέσματα	34

5.1. Έκκριση της α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό υλικό	34
5.2. Επίδραση της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης σε διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα	37
5.3. Χρήση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G και Scyllo-inositol ως ρυθμιστών της συσσωμάτωσης της ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης.....	39
5.4. Επίδραση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol σε διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα	43
5.5. In vitro κατεργασία του θρεπτικού υλικού που περιέχει την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM) με τις χημικές ενώσεις Congo red, Chrysamine G και scyllo-inositol.....	49
<u>6. Συζήτηση</u>	<u>52</u>
<u>Ευχαριστίες</u>	<u>58</u>
<u>7. Βιβλιογραφία</u>	<u>59</u>

1. Περίληψη

Η α-συνουκλεΐνη, είναι μια νευρωνική πρωτεΐνη με 140 αμινοξέα που έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό νευροεκφυλιστικών νόσων. Η παρουσία μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή, ήταν και η πρώτη ανακάλυψη που τη συνέδεσε με μια σπάνια οικογενή μορφή της νόσου Πάρκινσον. Στη συνέχεια αποκαλύφθηκαν και άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης που ανευρίσκονται σε οικογενείς μορφές της νόσου Πάρκινσον. Τα έγκλειστα που ονομάζονται σωμάτια Lewy και αποτελούνται από πρωτεϊνικά συσσωματώματα, ανευρέθηκαν στη νόσο Πάρκινσον και στην φλοιϊκή άνοια με σωμάτια Lewy, ενώ η βασική πρωτεΐνη από την οποία αποτελούνται είναι η α-συνουκλεΐνη. Συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης, έχουν εντοπιστεί και σε ένα ολοένα αυξανόμενο αριθμό νευροεκφυλιστικών νόσων, που το σύνολό τους αποδίδεται με τον χαρακτηρισμό συνουκλεϊνοπάθειες.

Η α-συνουκλεΐνη, φυσιολογικά βρίσκεται τόσο σε μια διαλυτή, χωρίς ιδιαίτερη δομή μορφή, όσο και σε μια πιο σταθερή μορφή με σχηματισμούς α-έλικας, που προσδένεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η φυσιολογική της λειτουργία στα κύτταρα είναι άγνωστη και πιθανολογείται ότι προϋποθέτει τον μετασχηματισμό της από τη μια μορφή στην άλλη. Η ανώμαλη αναδίπλωση της α-συνουκλεΐνης, ωστόσο, οδηγεί στη δημιουργία μη διαλυτών ινιδιακών δομών της πρωτεΐνης. Φαίνεται ότι μια πρώιμη δομή αυτών των συσσωματωμάτων, τα ονομαζόμενα πρωτοϊνίδια αποτελούν την πιο τοξική μορφή της α-συνουκλεΐνης.

Επομένως, η ανακάλυψη και χρήση ουσιών που έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δημιουργία αυτών των συσσωματώσεων ή ακόμη και να την αναστρέφουν, αποτελεί μια δυνητική θεραπευτική εφαρμογή. Ήδη έχουν δοκιμαστεί διάφοροι χημικοί αναστολείς της συσσωμάτωσης και τα πρώτα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης των ουσιών αυτών, συνίσταται στη δημιουργία διαλυτών ολιγομερών α-συνουκλεΐνης. Τα ολιγομερή αυτά, σε αντίθεση με τις ινιδιακές δομές και τα πρωτοϊνίδια δεν ελαττώνουν την επιβίωση των κυττάρων.

Μέχρι πρόσφατα, η α-συνουκλεΐνη εθεωρείτο μια αποκλειστικά κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Ωστόσο, μια σειρά από πρόσφατες έρευνες και παρατηρήσεις αποκάλυψε την παρουσία της πρωτεΐνης και σε εξωκυττάρια υγρά, όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα. Ο μηχανισμός έκκρισης της α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα παραμένει υπό διερεύνηση. Ενδεχομένως, το φαινόμενο αυτό της εξωκυττάρωσης της α-συνουκλεΐνης να λειτουργεί ως ενισχυτικός μηχανισμός διασποράς των εκφυλιστικών μεταβολών, από μια μικρή

ομάδα κυττάρων στους περιβάλλοντες αυτών ιστούς. Για το λόγο αυτό, δυνητικά αποτελεί και ένα θεραπευτικό στόχο στην παρεμπόδιση της διασποράς της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αρχικά την τοξικότητα της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας αποδεικνύουν ότι η α-συνουκλεΐνη που εκκρίνεται με φυσικό τρόπο από SHSY-5Y κύτταρα, είναι τοξική. Συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή θρεπτικού υλικού που περιείχε την φυσιολογικά εκκρινόμενη πρωτεΐνη σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων SHSY-5Y κυττάρων, παρατηρήσαμε ότι ένας αριθμός αυτών πεθαίνει.

Στη συνέχεια ελέγξαμε την αποτελεσματικότητα τριών χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική συσσωμάτωση: Congo red, Chrysamine G και *Scyllo*-inositol. Και οι τρεις αυτές ουσίες, έχουν χρησιμοποιηθεί έως τώρα σε μελέτες, όπου διερευνήθηκε η δράση τους στην κυτταροτοξικότητα που επάγεται από το αμυλοειδές β (Αβ) και έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν ή και αναστέλλουν την τοξικότητα αυτή. Σε αναλογία με το ρόλο της α-συνουκλεΐνης στη νόσο Πάρκινσον, το αμυλοειδές β σχηματίζει ολιγομερή συσσωματώματα που ενοχοποιούνται για την νευροτοξικότητα στη νόσο Αλτσχάιμερ.

Επειδή, ωστόσο οι χημικές αυτές ουσίες εμφανίζουν εγγενή τοξικότητα, πραγματοποιήσαμε μια σειρά από πειράματα, όπου αρχικά προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε την ιδανική δόση για κάθε αναστολέα. Ως ιδανική, θεωρούμε τη δόση εκείνη η οποία θα είναι αποτελεσματική ως προς την ανασταλτική της δράση στη δημιουργία συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης και ταυτόχρονα θα προκαλεί τη μικρότερη δυνατή κυτταροτοξικότητα.

Τα τελικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρεις παραπάνω ουσίες μειώνουν την τοξικότητα που προκαλείται από την εφαρμογή θρεπτικού υλικού που περιέχει εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, όταν αυτό προστεθεί σε διαφοροποιημένα κύτταρα νευροβλαστώματος.

1. Summary

Alpha-synuclein is a 140 amino acid neuronal protein that has been associated with several neurodegenerative diseases. A point mutation in the gene coding for the a-synuclein protein was the first discovery linking this protein to a rare familial form of Parkinson's disease. Subsequently, other mutations in the a-synuclein gene have been identified in familial Parkinson's disease. The aggregated proteinaceous inclusions called Lewy bodies found in Parkinson's disease and cortical Lewy body dementia were discovered to be predominantly a-synuclein. Aberrant aggregation of a-synuclein has been detected in an increasing number of neurodegenerative diseases, collectively known as synucleopathies.

α -synuclein exists physiologically in both soluble and membrane-bound states, in unstructured and α -helical conformations, respectively. The physiological function of α -synuclein appears to require its translocation between these subcellular compartments and interconversion between the 2 conformations. α -synuclein's propensity to oligomerize and form fibrils may be central to its toxicity. A precursor of those filamental structures, called protofibrils appears to be the most toxic formation.

Thus, agents that block or prevent the formation of oligomers and/or fibrils might be neuroprotective. Already, several compounds have been tested for their ability to inhibit the assembly of α -synuclein into filaments *in vitro*. Biochemical analysis revealed the formation of soluble oligomeric α -synuclein in the presence of inhibitory compounds, suggesting that this may be the mechanism by which filament formation is inhibited. Unlike α -synuclein filaments and protofibrils, these soluble oligomeric species did not reduce the viability of cells.

Until recently, α -synuclein was considered to exist as a conventional cytosolic protein. However, a series of new observations demonstrate the presence of α -synuclein in extracellular biological fluids, such as cerebrospinal fluid and plasma. The exact mechanism of this secretion has not been characterized. Thus, exocytosis of α -synuclein may be an important mechanism of amplifying and spreading degenerative changes from a small group of cells to its surrounding tissues, and it potentially provides therapeutic targets for halting the progression of the disease.

In the present study we examine the possible cytotoxic effect of secreted α -synuclein species and the role of three inhibitory compounds: Congo red, Chrysamine G, *Scyllo*-inositol. These compounds have been used so far in studies with oligomeric aggregates of amyloid β peptide, which is responsible for cytotoxicity in Alzheimer's disease and it has been found that they reduce or even inhibit Ab-induced toxicity.

However, these compounds are themselves cytotoxic. Due to this, we performed a number of experiments in order to determine the "ideal" dose, and with this we mean the dose that has the most reducing result in aggregation and simultaneously the less toxic effect in cells' survival.

Our results showed that secreted α -synuclein species are cytotoxic. On the other hand, when the three compounds were added to conditioned medium, containing naturally secreted α -synuclein species, they produced a reduction in the cytotoxic effects caused by the application of this medium on differentiated neuroblastoma cells.

2. Εισαγωγή

2.1.Νευροεκφυλιστικές νόσοι

Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται νόσοι άγνωστης αιτίας και αβέβαιης παθογένειας, που μπορεί να παρουσιάζουν και κληρονομικό χαρακτήρα, και χαρακτηρίζονται από χρόνια καταστροφή του νευρικού ιστού. Έχουν βραδεία, «ύπουλη» έναρξη, προϊούσα εξέλιξη και διάχυτη συμπτωματολογία, με χαρακτηριστική τάση για συστηματοποίηση. Τα πιο γνωστά παραδείγματα νευροεκφυλιστικών νόσων είναι η νόσος Αλτσχάιμερ (AD), η νόσος Πάρκινσον (PD), η νόσος Huntington (HD), η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (ALS) και οι νόσοι prion (όπως η νόσος Jacobs-Creutzfeld) (Ross and Poirer, 2004).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται ολοένα και πιο εμφανές ότι οι νόσοι αυτές παρουσιάζουν κοινούς κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους περιλαμβάνονται ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματώσεων και ενδοκυτταρικών εγκλείστων. Τα συσσωματώματα αυτά αποτελούνται συνήθως από ινιδιακές δομές που προέρχονται από ανώμαλα αναδιπλούμενες πρωτεΐνες.

Η επικρατέστερη θεωρία σήμερα, είναι ότι οι συσσωματώσεις και τα εγκλείστα αντιπροσωπεύουν το τελευταίο στάδιο ενός μοριακού «καταρράκτη» αντιδράσεων, τα πρώιμα στάδια του οποίου σχετίζονται πιο άμεσα με την παθογένεια της νόσου, δηλαδή τα πρωτοϊνίδια και όχι οι τελικές συσσωματωμένες μορφές αποτελούν την τοξική μορφή της πρωτεΐνης (Conway et al., 2001, E.H. Norris et al., 2005). Σε αρκετές περιπτώσεις, έχει αποδειχτεί εξάλλου η εμπλοκή γενετικών παραγόντων στις πιο κοινές σποραδικές μορφές των νόσων (Νευρολογία Λογοθέτη 2004).

2.2.Νόσος Πάρκινσον

Γνωστή από τους αρχαίους χρόνους, περιγράφηκε για πρώτη φορά με αδιάσειστα στοιχεία από τον James Parkinson το 1817 στη μονογραφία του με τίτλο "Essay on the Shaking Palsy" ως εξής: *«η νόσος χαρακτηρίζεται από ακούσια τρομώδη κίνηση, με ελάττωση της μυϊκής ισχύος στα τμήματα του σώματος που βρίσκονται σε ηρεμία ή υποστηρίζονται, με τάση πρόσθιας κλίσης του κορμού και επιτάχυνσης του βήματος και με την αισθητικότητα και τη νοημοσύνη ανεπηρέαστες»*

Η ιδιοπαθής νόσος Πάρκινσον είναι μια προοδευτικά εξελισσόμενη νόσος με κύριες εκδηλώσεις τον τρόπο ηρεμίας, τη δυσκαμψία, τη βραδυκίνησια και την απώλεια των αντανακλαστικών στάσεων (διορθωτικών αντιδράσεων). Παθολογοανατομικά, το κυριότερο εύρημα είναι οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις στην

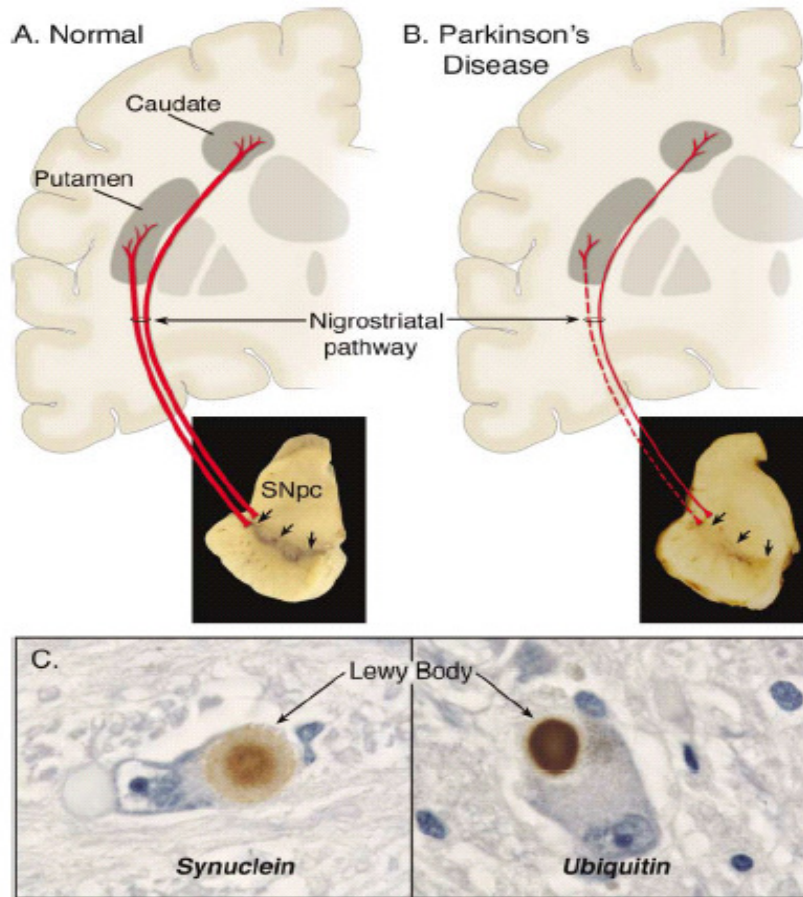
περιοχή της μέλαινας ουσίας στο μεσεγκέφαλο και άλλων μονοαμινεργικών πυρήνων, καθώς και κυττάρων της ωχράς σφαίρας και του ραβδωτού σώματος. Μακροσκοπικά, παρατηρείται αποχρωματισμός της μέλαινας ουσίας (Εικόνα 1). Μικροσκοπικά, υπάρχει απώλεια νευρώνων, αύξηση της νευρογλοίας, κυτταροπλασματικά έγκλειστα από εναπόθεση ανώμαλης πρωτεΐνης (κυρίως α-συνουκλείνης και ουμπικουϊτίνης), που ονομάζονται σωμάτια Lewy καθώς και σχοινοειδείς εναποθέσεις στους νευρίτες (νευρίτες Lewy) (Dauer and Przedborski, 2003).

Η σπουδαιότητα της εναπόθεσης ανώμαλων δομών α-συνουκλείνης έχει διαφανεί, πέρα από τις πρώτες μελέτες που την εντόπισαν στην μέλαινα ουσία σε σποραδική νόσο Πάρκινσον και στο νεοφλοιό σε άνοια με διάχυτα σωμάτια Lewy, από το γεγονός ότι η εναπόθεση αυτή φαίνεται να επισυμβαίνει με ένα σταδιακό τρόπο, ξεκινώντας από πυρηνικές δομές στο κατώτερο στέλεχος, και ακολουθώντας μία ανιούσα πορεία. Μόνο σε ένα τρίτο στάδιο φαίνεται να επηρεάζεται η μέλαινα ουσία (Braak et al., 2006). Αυτό υποδεικνύει ότι η ανώμαλη αυτή εναπόθεση προηγείται της νευρωνικής εκφύλισης και των κλασσικών κινητικών συμπτωμάτων της νόσου και πιθανώς αποτελεί τη γενεσιουργό τους αιτία. Η παρουσία σωματίων και νευριτών Lewy σε περιοχές εκτός του μεσεγκεφάλου, θεωρείται ότι συμπίπτει με την εμφάνιση της δευτερεύουσας συμπτωματολογίας της νόσου, που περιλαμβάνει κατάθλιψη, άνοια και διαταραχές από το αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Η νόσος Πάρκινσον αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης νευροεκφυλιστική νόσο μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ, με ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 0.5-1% σε άτομα ηλικίας 65-69 ετών και αυξάνει κατά 1-3 ποσοστιαίες μονάδες σε άτομα 80 ετών και άνω (στο γενικό πληθυσμό η συχνότητα της νόσου ανέρχεται σε 0.5-1‰). Η έναρξη της νόσου εμφανίζεται μετά την 5^η δεκαετία, είναι σπάνια σε νεανική ηλικία και προσβάλλονται συχνότερα οι άνδρες σε αναλογία 3:2 (Νευρολογία Mumenthaler, 2002).

Σύμφωνα με όλο και περισσότερα στοιχεία από έρευνες τα τελευταία χρόνια, στους πιθανούς μηχανισμούς που έχουν ενοχοποιηθεί για τη νόσο Πάρκινσον εντάσσεται η συσσώρευση ανώμαλα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών. Κάποιες μεταλλάξεις, προάγουν απευθείας τη δημιουργία τέτοιων συσσωματωμάτων (όπως πιστεύεται για την α-συνουκλείνη), ενώ άλλες προσβάλλουν τον κυτταρικό μηχανισμό που εντοπίζει και αποδομεί τα συσσωματώματα αυτά (όπως οι Parkin, UCH-L1). Το οξειδωτικό στρες, που συνδέεται με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τον ανώμαλο μεταβολισμό της ντοπαμίνης αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα που προάγει τη δημιουργία ανώμαλων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων.

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής (A) και της παθολογικής (B) στη νόσο Πάρκινσον μελαινοραβδωτής οδού. Υπάρχει εκσεσημασμένη απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων που προβάλλουν στην ωχρά σφαίρα και μικρότερη εκείνων που προβάλλουν στο κέλυφος (C) Εικόνες ανοσοϊστοχημείας όπου επισημαίνονται τα σωμάτια Lewy με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης (αριστερά) και έναντι της ουμπικουΐτινης (δεξιά)

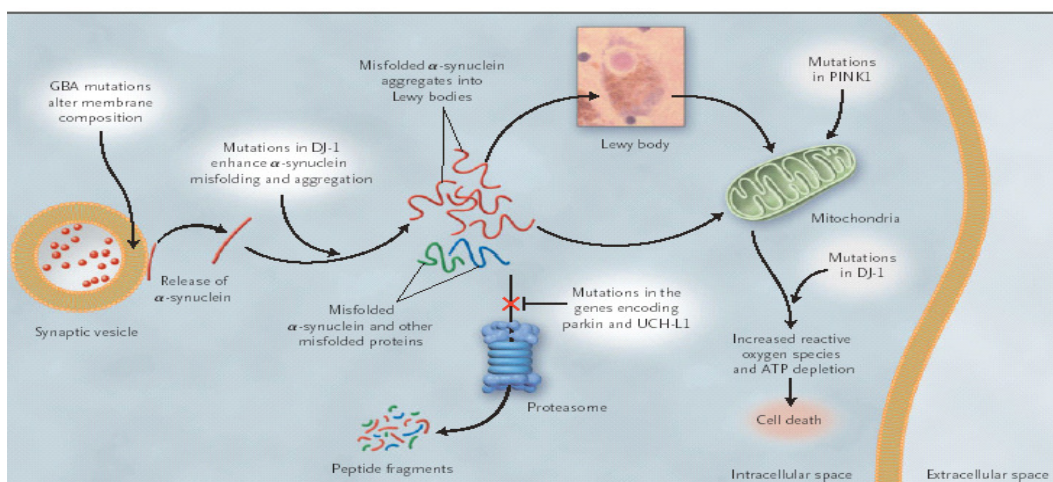


Παραμένει άγνωστο αν η ανώμαλη αναδίπλωση πρωτεϊνών προκαλεί βλάβες στα κύτταρα άμεσα ή μέσω σχηματισμού συσσωματωμάτων (πχ. σωμάτια Lewy). Το οξειδωτικό στρες, τα ενεργειακά ελλείμματα (πχ. έλλειψη ATP) και η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης θεωρούνται παράγοντες που επίσης μπορούν να επάγουν το θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο Πάρκινσον (Dauer and Przedborski 2003, Feany 2004).

Ένας σχηματικός τρόπος των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην νόσο Πάρκινσον παρουσιάζεται στην εικόνα 2.

Εικόνα 2. Αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που έχουν σχετιστεί με τη νόσο Πάρκινσον.

Η πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης στις λιπιδικές μεμβράνες, προστατεύει την πρωτεΐνη από παθολογική αναδίπλωση και δημιουργία συσσωματώσεων. Μεταλλάξεις σε μια υδρολάση τη GBA, αλλοιώνουν τη σύνθεση των λιπιδίων και προάγουν τη συσσώρευση α-συνουκλεΐνης κυτταροπλασματικά, η οποία παρουσιάζει τάση για ανώμαλη αναδίπλωση και σχηματισμό των σωματίων Lewy. Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης DJ-1 επίσης προάγουν αυτή τη διαδικασία και δρουν και σε άλλα υποστρώματα, εκτός της α-συνουκλεΐνης. Μεταλλάξεις στην parkin και UCH-L1 παρεμποδίζουν την ικανότητα του κυττάρου να απομακρύνει τις ελαττωματικές πρωτεΐνες. Η ανώμαλη αναδίπλωση και συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και πιθανώς και άλλων πρωτεϊνών επάγει την διαδικασία του οξειδωτικού στρες και της ενεργειακής έκπτωσης. Μεταλλάξεις της PINK1 επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία και η απάντηση στο οξειδωτικό στρες βασίζεται στη φυσιολογική λειτουργία της DJ-1 (Mel B. Feany, 2004).



2.2.1. Οικογενείς και σποραδικές μορφές της Νόσου Πάρκινσον-συσχέτιση με την α-συνουκλεΐνη

Αρχικά, είχε θεωρηθεί ότι η νόσος Πάρκινσον ήταν μια εξ'ολοκλήρου σποραδική νόσος. Ωστόσο, η εξέλιξη στη μοριακή γενετική έχει καταδείξει σημαντικές γενετικές επιρροές στην ανάπτυξη της νόσου. Οκτώ χαρακτηρισμένοι γενετικοί τόποι σε πέντε διαφορετικά γονίδια έχουν συσχετιστεί με αυτοσωματικό επικρατούντα ή υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (Πίνακας 1).

Πιο συγκεκριμένα, έχουν ενοχοποιηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, μιας πρωτεΐνης με άγνωστη λειτουργία που έχει βρεθεί ότι αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (Spillantini et al., 1997, 1998). Ορισμένες οικογένειες στην Ιταλία, που περιλαμβάνονταν στο Contursi kindred, και στην Ελλάδα, που εμφάνιζαν έναν αυτοσωματικό κυρίαρχο τρόπο κληρονομικότητας της νόσου Πάρκινσον, παρουσίαζαν μια μετάλλαξη, την A53T, στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη στο χρωμόσωμα 4 (Polymeropoulos et al., 1997). Σε οικογένειες στη Γερμανία εντοπίστηκε η μετάλλαξη A30P της α-συνουκλεΐνης, που κληρονομείται με τον ίδιο τρόπο (Kruger et al., 1998), ενώ μια τρίτη μετάλλαξη η E46K εντοπίστηκε σε μια ισπανική οικογένεια, κληρονομείται με

αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο και αφορά το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης (Zarrantz et al., 2004).

Πίνακας 1. Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη νόσο του Πάρκινσον (προσαρμογή από Mel B. Feany, 2004)

Γενετικός τόπος	Χρωμοσωμική εντόπιση	Τρόπος κληρονομικότητας	Πρωτεΐνη	Δράση	Γεωγραφική εντόπιση
PARK1	4q21	Αυτοσωματικός επικρατούν	α-συνουκλεΐνη	άγνωστη	Ελλάδα, Ιταλία και Γερμανία
PARK2	6q25.2-27	Αυτοσωματικός υπολειπόμενος (ή επικρατούν)	parkin	Ε3 λιγάση της ουμπικουΐτινης	
PARK3	2p13	Αυτοσωματικός επικρατούν	άγνωστη		Γερμανία
PARK4	4q21	Αυτοσωματικός επικρατούν	α-συνουκλεΐνη	άγνωστη	ΗΠΑ
PARK5	4p14	Αυτοσωματικός επικρατούν	UCH-L1	Υδρολάση του C-άκρου της ουμπικουΐτινης	Γερμανία
PARK6	1p36	Αυτοσωματικός υπολειπόμενος	PINK-1	Πρωτεϊνική κινάση των μιτοχονδρίων	Ιταλία
PARK7	1p36	Αυτοσωματικός υπολειπόμενος	DJ-1	Σαπερόνη, απόκριση στο οξειδωτικό στρες	Ολλανδία
PARK8	12p11.2-13.1	Αυτοσωματικός επικρατούν	άγνωστη		Ιαπωνία
PARK9	1p36	Αυτοσωματικός υπολειπόμενος	άγνωστη		
GBA	1q21	Ευεπιφορότητα	GBA	υδρολάση	

Σε σπάνιες οικογένειες υπάρχει διπλασιασμός ή τριπλασιασμός της χρωμοσωμικής περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης στο ένα χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασής της κατά ποσοστό 50-100%. Ανάλογη με το ποσοστό αύξησης είναι και η κλινική εικόνα, που εμφανίζεται πιο πρώιμα και με σημεία άνοιας σωματίων Lewy στις περιπτώσεις μόνο με διπλασιασμό της ολικής ποσότητας της α-συνουκλεΐνης (Chartier-Harlin M.C. et al. 2004, Singleton et al. 2003). Επομένως, υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της δόσης της α-συνουκλεΐνης και της βαρύτητας της νόσου. Αυτά τα γενετικά ευρήματα καταδεικνύουν ότι οι σημειακές μεταλλάξεις πιθανότατα οδηγούν σε μια

τοξική δράση που υποκρύπτεται και στην φυσιολογική πρωτεΐνη, και εκδηλώνεται μόνο όταν τα επίπεδά της ξεπεράσουν κάποιο όριο.

Συνηγορητικά, για την σπουδαιότητα της α-συνουκλείνης και στην σποραδική νόσο αποτελούν τα δεδομένα από διάφορες ομάδες που συσχετίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης σποραδικής νόσου Πάρκινσον με πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή της α-συνουκλείνης, ή με άλλες περιοχές του γονιδίου (Farrer et al., 2001, Mueller JC. et al., 2005, Mizuta I et al., 2006, Hadjigeorgiou GM et al., 2006, Maraganore DM et al., 2006). Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να οδηγούν σε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας της α-συνουκλείνης (Chiba-Falek O. et al., 2001). Επομένως, γενετικά προκαθορισμένες ποικιλίες του γονιδίου της α-συνουκλείνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην σποραδική νόσο.

Η ανώμαλη εναπόθεση α-συνουκλείνης απεδείχθη ότι συνέβαινε και σε άλλα νοσήματα, που καλούνται «συνουκλείνοπάθειες», όπως η ατροφία πολλαπλών συστημάτων, η άνοια με διάχυτα σωμάτια Lewy, η παραλλαγή της νόσου Αλτσχάιμερ με σωμάτια Lewy και άλλες ασθένειες. Όλα αυτά τα νοσήματα παρουσιάζουν εναπόθεση α-συνουκλείνης σε μορφή εγκλειστων συσσωματωμάτων. Στη νόσο Πάρκινσον η εναπόθεση ανώμαλων δομών α-συνουκλείνης φαίνεται να λαμβάνει χώρα με ένα σταδιακό τρόπο, ξεκινώντας από πυρηνικές δομές στο κατώτερο στέλεχος, και ακολουθώντας μία ανιούσα πορεία. Μόνο σε ένα τρίτο στάδιο φαίνεται να επηρεάζεται η μέλαινα ουσία, υποδεικνύοντας ότι η ανώμαλη αυτή εναπόθεση προηγείται της νευρωνικής εκφύλισης και των κλασσικών κινητικών συμπτωμάτων της νόσου και πιθανώς αποτελεί τη γενεσιουργό τους αιτία.

Άλλες μεταλλάξεις που έχουν ανευρεθεί σε πάσχοντες από νόσο Πάρκινσον αφορούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την parkin μια πρωτεΐνη με λειτουργία E3 λιγάσης της ουμπικουΐτινης (Kitada et al., 1998, Farrer et al., 2001, Bonifati et al., 2003, Lincoln et al., 2003), στο γονίδιο της UCH-L1 (Leroy et al., 1998), μιας πρωτεΐνης με δράση υδρολάσης της ουμπικουΐτινης, καθώς και στην PINK1 μια πρωτεΐνη με δράση κινάσης των μιτοχονδρίων (Vallente et al., 2004).

Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο της DJ-1 έχουν συσχετιστεί με οικογενείς μορφές της νόσου Πάρκινσον (Petruccelli et al., 2002, Shendelman et al., 2004). Η DJ-1 είναι μια πρωτεΐνη της οποίας ο ρόλος δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα: σύμφωνα με κάποιες μελέτες συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα, ενώ κατά άλλες παίζει ρόλο στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες.

Επιπροσθέτως, από μελέτες σε παρκινσονικούς ασθενείς Εβραίους Ασκανάζι, έχει ενοχοποιηθεί μια υδρολάση, η GBA. Ο ρόλος της στην παθογένεια της νόσου Πάρκινσον είναι ακόμη υπό διερεύνηση, αλλά πιθανολογείται ότι δρα συνεργικά με

άλλους παράγοντες στην ανώμαλη εναπόθεση α-συνουκλεΐνης. (Feany et al., 2004, Wong et al., 2004).

2.2.2.α-συνουκλεΐνη

2.2.2.1. Δομή, εντόπιση και φυσιολογική λειτουργία της α-συνουκλεΐνης

Η πρώτη πρωτεΐνη που βρέθηκε ότι εμπλέκεται στη νόσο Πάρκινσον ήταν η α-συνουκλεΐνη. Πρόκειται για μία μικρή σχετικά νευρωνική πρωτεΐνη 140 αμινοξέων, της οποίας η λειτουργία δεν είναι επακριβώς γνωστή. Η ονομασία της προέρχεται από την αρχική ανεύρεσή της σε συνάψεις και πυρήνες. Εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες, αλλά έκφρασή της έχει αναφερθεί επίσης σε ποικίλους άλλους τύπους κυττάρων, όπως κύτταρα γλοίας, αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα (Clayton D. F. et al., 1998, Clayton D. F. et al., 1999, Mori F. et al., 2002, Park S. M. Et al., 2002).

Ο ακριβής εντοπισμός της μέσα στα νευρωνικά κύτταρα παραμένει ασαφής. Στο ώριμο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στις νευρωνικές απολήξεις, σε προσυναπτικές περιοχές, σε παρασκευάσματα προσυναπτικών κυστιδίων, χωρίς όμως να ανευρίσκεται μέσα σε αυτά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη μελέτη, όπου η α-συνουκλεΐνη μετατοπίζεται από τις νευρωνικές απολήξεις μετά από νευρωνική δραστηριοποίηση (Iwai et al., 1995, Jakes et al., 1994, Masliah et al., 1996, Petersen et al., 1999, Hurtig et al., 2000).

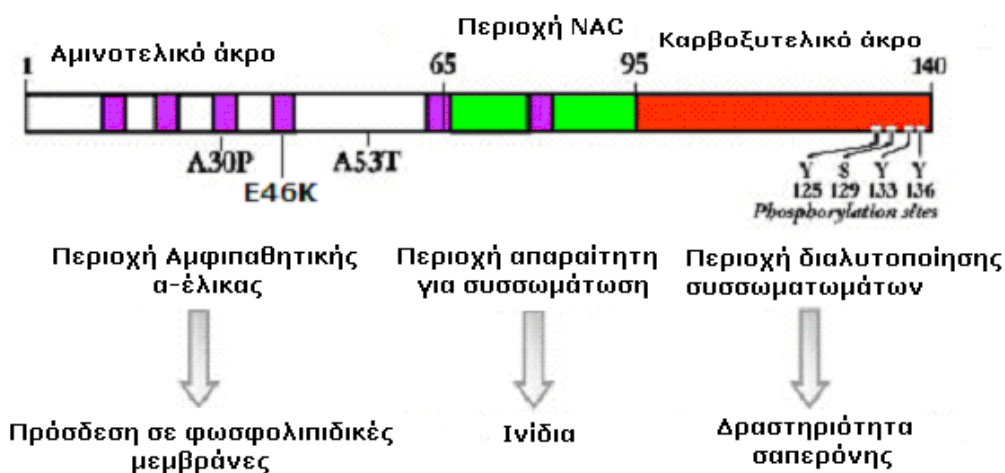
Σε ουδέτερο pH, στην μετουσιωμένη της μορφή, δεν έχει ιδιαίτερη δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή. Παρουσιάζει τάση πολυμερισμού, σχηματίζοντας πρώτα διαλυτά, και σταδιακά μη διαλυτά ολιγομερή, δημιουργεί συσσωματώματα, και τελικά ινιδιακές δομές, που θεωρείται ότι αποτελούν την βάση για την δημιουργία των σωματίων Lewy. Οι ινιδιακές αυτές δομές έχουν στοιχεία που προσομοιάζουν με το β-αμυλοειδές.

Η α-συνουκλεΐνη εμπεριέχει 3 βασικές περιοχές (Εικόνα 3), την αμινοτελική περιοχή με επαναληπτικές δομές με την αλληλουχία KTKGV που προσομοιάζουν με δομές απολιποπρωτεϊνών, την κεντρική περιοχή NAC που είναι επαρκής αλλά και απαραίτητη για την δημιουργία ινιδιακών δομών, και την καρβοξυτελική περιοχή που έχει αρνητικό φορτίο και φαίνεται να αναστέλλει την τάση της α-συνουκλεΐνης για συσσωμάτωση.

Η α-συνουκλεΐνη μπορεί να υποστεί διάφορες μετα-μεταφραστικές αλλοιώσεις, ειδικότερα φωσφορυλίωση, οξειδωση-νιτροσυλίωση, και κατάτμηση προς τις καρβοξυλικές περιοχές (Li et al., 2005, Giasson et al., 2006, Anderson et al., 2006, Fujiwara et al., 2002). Θεωρείται ότι αυτές οι αλλοιώσεις μεταβάλλουν

την τάση της να δημιουργεί ολιγομερή και συσσωματώματα. Είναι πιθανό τέτοιοι παράγοντες να παίζουν μείζονα ρόλο στην ανώμαλη εναπόθεση α-συνουκλεΐνης στην σποραδική νόσο Πάρκινσον, και να συντείνουν στην τοξική της δράση.

Εικόνα 3. Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης όπου καταγράφονται οι τρεις περιοχές: το αμινοτελικό άκρο, το οποίο είναι ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή (αλληλουχία 1-65) και περιλαμβάνει παραλλαγές της αλληλουχίας KTKEGV που προσομοιάζουν με δομές απολιποπρωτεϊνών, το κεντρικό υδρόφοβο τμήμα (αλληλουχία 66-95) που εμπεριέχει την περιοχή NAC η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ινιδιακών δομών και το καρβοξυτελικό άκρο (αλληλουχία 96-140) το οποίο διαφοροποιείται στα διάφορα είδη και φαίνεται να παίζει ρόλο σαπερόνης αναστέλλοντας την τάση της α-συνουκλεΐνης για συσσωμάτωση. Σημειώνονται επίσης οι θέσεις των σημειακών μεταλλάξεων A30P, A53T και E46K (Recchia et al., 2004)



Η λειτουργία της α-συνουκλεΐνης παραμένει αδιευκρίνιστη. Θεωρείται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας (Abeliovich et al., 2000) στη νευρωνική διαφοροποίηση καθώς και στη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης (Perez et al., 2002). Επίσης, της έχουν αποδοθεί ιδιότητες μοριακής σαπερόνης (Souza et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες παρέχουν στοιχεία ότι η α-συνουκλεΐνη διαθέτει κάποιες κοινές ιδιότητες με πρωτεΐνες-μεταφορείς λιπαρών οξέων διαμέσου των μεμβρανών των νευρώνων (Cole et al., 2002, Sharon et al., 2001). Έχει επιπλέον καταδειχθεί ότι νευρικά κύτταρα στα οποία υπάρχει υπέρκφραση του αγρίου τύπου της πρωτεΐνης είναι περισσότερο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες σε σχέση με κύτταρα μάρτυρες. Τέλος, υπάρχουν μελέτες όπου φαίνεται ότι εξωγενής, μη συσσωματωμένη πρωτεΐνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις προστατεύει τα νευρικά κύτταρα σε στρεσογόνες για τα κύτταρα συνθήκες, όπως η διατροφική ένδεια, το οξειδωτικό στρες και η διεγερσιτοξικότητα (Hedge et al., 2003). Αντιθέτως, τα συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης βρέθηκε ότι είναι τοξικά για τα νευρικά κύτταρα, πιθανώς μέσω δημιουργίας υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Οι πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες της α-συνουκλεΐνης συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες της α-συνουκλεΐνης (προσαρμογή από Hedge et al., 2003)

Συναπτική πλαστικότητα: αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με εγκεφαλικά κυστίδια και φωσφολιπιδικές μεμβράνες
Ανάπτυξη και διατήρηση των συνάψεων: εντοπίστηκε σε αναπτυσσόμενες προ-συναπτικές απολήξεις
Νευρωνική διαφοροποίηση: επεξεργασία κυττάρων PC12 με τον αυξητικό παράγοντα των νεύρων (NGF) προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης
Μεταβολισμός λιπιδίων: η α-συνουκλεΐνη παρουσιάζει αυξημένη τάση πρόσδεσης σε μόρια με μεγάλο υδρόφοβο περιεχόμενο ή εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές
Δυναμική των κυστιδίων: ο αριθμός των κυστιδίων στις προσυναπτικές απολήξεις μειώθηκε όταν η έκφραση της α-συνουκλεΐνης ήταν σημαντικά ελαττωμένη σε καλλιέργεια κυττάρων από αρουραίο ή σε knock-out ποντίκια
Φλεγμονώδεις διαδικασίες και ανοσο-απόκριση: τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης αυξήθηκαν μετά από διέγερση με ιντερλευκίνη-1β σε ανθρώπινη κυτταρική καλλιέργεια αστροκυττάρων
Τροποποίηση της τ (tau) λειτουργίας: η ικανότητα της α-συνουκλεΐνης να φωσφορυλιώνει τη σερίνη-262 της (τ), αναστέλλει την πρόσδεση της tau στους μικροσωληνίσκους

2.2.2.2. Εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη δε διαθέτει αλληλουχία πρόσδεσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μέχρι πρόσφατα εθεωρείτο αποκλειστικά ενδοκυττάρια πρωτεΐνη.

Από πρόσφατες μελέτες προέκυψαν στοιχεία για την ύπαρξη μιας εξωκυττάριας μορφής α-συνουκλεΐνης που απελευθερώνεται από τους νευρώνες και εντοπίζεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα, καθώς και σε θρεπτικό μέσο από καλλιέργειες με ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος (Borghì et al., 2000, El-Agnaf et al., 2003, Miller et al., 2004). Η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη εντοπίστηκε τόσο σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον όσο και σε υγιείς, ενώ τα επίπεδά της στο πλάσμα βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με την οικογενή νόσο Πάρκινσον που φέρουν τον τριπλασιασμό του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης.

In vitro, η έκκριση της α-συνουκλεΐνης έχει διερευνηθεί με μελέτες διαμόλυνσης μέσω αδενοϊού, του cDNA της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης, σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY-5Y (Lee et al., 2005), με μελέτες

επιμόλυνσης με το πλασμίδιο της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-BE (Sung et al., 2005) και με τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος M17 που υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη, μετά από επιμόλυνση με το cDNA της (El-Agnaf et al., 2003) .

Ωστόσο, δεν έχει διασαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η έκκριση της α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα. Τα δύο πιθανά μονοπάτια έκκρισης είναι: εκείνο που εξαρτάται από το σύστημα Golgi-ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και ένας ανεξάρτητος, μη συμβατικός μηχανισμός.

Σύμφωνα με το πρώτο μονοπάτι, που προτείνεται από την ομάδα του El-Agnaf, τα δυο δισόξινα μοτίβα Asp-X-Glu, που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό(C-) άκρο της α-συνουκλεΐνης, αποτελούν αλληλουχία σηματοδότησης για τη μεταφορά από το ER στο Golgi και αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα πρωτεϊνών COPII του ER (Barlowe 2002). Παρόλο που η α-συνουκλεΐνη στερείται σηματοδότησης πρόσδεσης στο ER, η αμφιπαθητική δομή α-έλικας που διαθέτει την καθιστά ικανή να προσδένεται στα λιπίδια των μεμβρανών (Sharon et al., 2001, Narayanan et al., 2001) και να τις διαπερνά. Εφόσον, λοιπόν η πρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί στο ER, στη συνέχεια μέσω του συμπλέγματος COPII μεταφέρεται στο Golgi, και από εκεί μπορεί να εκκριθεί από το κύτταρο. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία ότι τα δισόξινα μοτίβα, Asp-X-Glu, αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα της πρωτεΐνης-3 και εμπλέκονται στην επιφανειακή μεταφορά στο Golgi (Nishimura et al., 2002). Συνηγορητικό, τέλος για τα ανωτέρω, αποτελεί το γεγονός ότι η β- και γ-συνουκλεΐνη, που δεν εκκρίνονται, δεν περιέχουν αυτά τα δυο μοτίβα (Εικόνα 4).

Εικόνα 4. Αλληλουχία των αμινοξέων του C-άκρου της α-, β- και γ- συνουκλεΐνης. Μόνο το μόριο της α-συνουκλεΐνης περιέχει τα δυο δισόξινα μοτίβα Asp-X-Glu, τα οποία στο σχήμα είναι υπογραμμισμένα (Nishimura et al., 2002).

α-syn	120	<u>PDNEAYEMPSEEG</u> ----- <u>YQDYERPEA</u>	140
β-syn	109	EP LM EP EG ESYEDPPQEEYQEYERPEA	134
γ-syn	120	E EA QSGGD	127

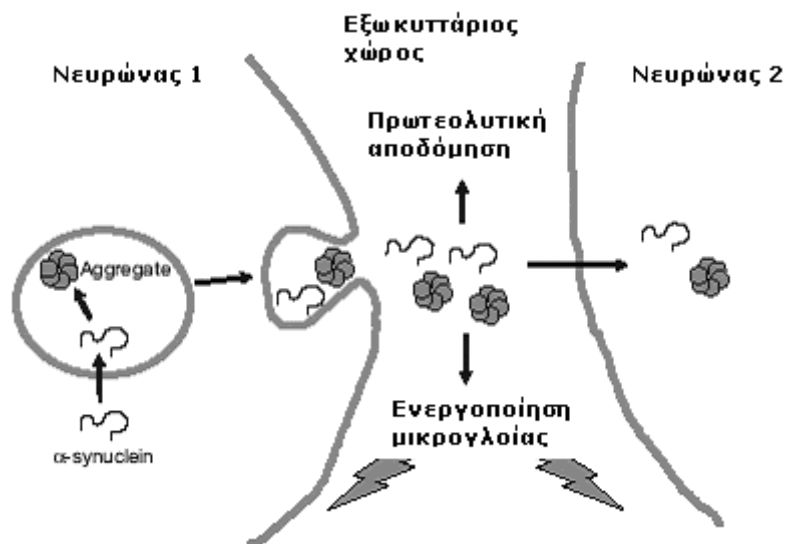
Στο μη συμβατικό μονοπάτι, όπου η έκκριση δεν εξαρτάται από το σύστημα Golgi-ER ένας δυνητικός μηχανισμός είναι η ανακύκλωση ενδοσωμάτων και ένας άλλος η παραγωγή εξωσωμάτων (Nickel et al., 2003).

Οι S-J. Lee και συνεργάτες, προτείνουν τον πιο ολοκληρωμένο υποθετικό μηχανισμό μη συμβατικής έκκρισης. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ένα μικρό ποσό

κυτταροπλασματικής α-συνουκλεΐνης εισέρχεται σε κυστίδια και εκκρίνεται από τα κύτταρα με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης. Η ταυτότητα αυτών των κυστιδίων παραμένει άγνωστη. Το ποσό αυτό της πρωτεΐνης, εμφανίζει μεγαλύτερη τάση για συσσώμωση, σε σχέση με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Lee et al., 2005). Διαπιστώθηκε, εξάλλου ότι μείωση της θερμοκρασίας, που αποτελεί παράγοντα αναστολής της εξωκυττάρωσης, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα. Επιπλέον, η έκκριση της α-συνουκλεΐνης, δεν επηρεάστηκε από την παρουσία βρεφελντίνης Α (BFA), ενός αναστολέα της έκκρισης μέσω του συστήματος ER-Golgi, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης ενός μη συμβατικού μηχανισμού έκκρισης (Lee et al., 2005).

Το υποθετικό μοντέλο του S-J. Lee, απεικονίζεται σχηματικά στην εικόνα 5.

Εικόνα 5. Υποθετικό μοντέλο της έκκρισης και της λειτουργίας της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης. Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη απομακρύνεται από τον εξωκυττάριο χώρο με πρωτεολυτική αποδόμηση ή εισέρχεται σε γειτονικά κύτταρα. Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο, μπορεί να ενεργοποιήσει τα μικρογλοιακά κύτταρα και να προκαλέσει νευροεκφυλισμό μέσω αντιδράσεων φλεγμονής. (προσαρμογή από S-J. Lee 2008)



2.2.2.3. Τοξικές μορφές α-συνουκλεΐνης-μηχανισμοί τοξικής δράσης-παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία συσσωματώσεων

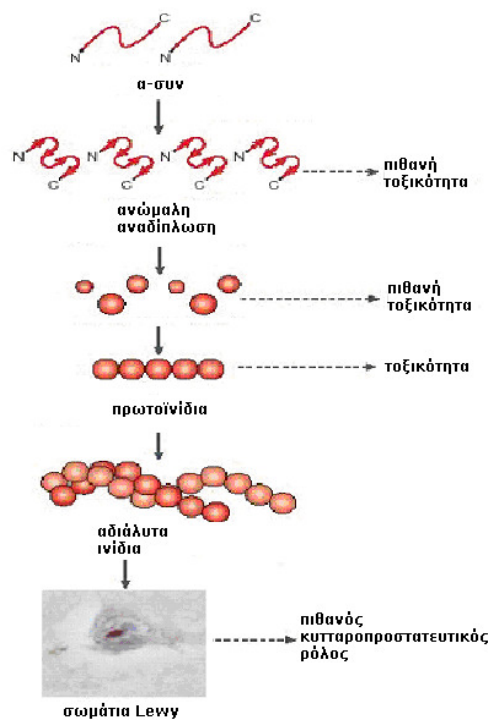
In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι επώαση της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης υπό ορισμένες συνθήκες οδηγεί σταδιακά στην δημιουργία μη διαλυτών ινιδίων και συσσωματώσεων. Η παρουσία της μεταλλάξης A53T, αλλά όχι της A30P, οδηγεί στην πιο γρήγορη και έντονη δημιουργία συσσωματώσεων. Και οι δύο όμως μεταλλάξεις έχουν μία μεγαλύτερη ροπή στη δημιουργία πρόδρομων μορφών των ινιδίων, που ονομάζονται πρωτοϊνίδια (protofibrils), σε σχέση με την αγρίου τύπου

πρωτεΐνη. Η E46K μετάλλαξη σχηματίζει και αυτή, όπως και η A53T, ινίδια και συσσωματώσεις.

Η κοινή δράση των μεταλλάξεων στο επίπεδο των πρωτοϊνιδίων ενισχύει τη θεωρία ότι τα πρωτοϊνίδια και όχι οι πιο ώριμες συσσωματωμένες μορφές αποτελούν την τοξική μορφή της α -συνουκλεΐνης (Εικόνα 6). Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ντοπαμίνη και άλλες κατεχολαμίνες εμποδίζουν την μετατροπή *in vitro* της α -συνουκλεΐνης από πρωτοϊνιδιακή σε ινιδιακή μορφή, κάτι που θα μπορούσε να συνδεθεί με την σχετικά επιλεκτική βλάβη των ντοπαμινεργικών και άλλων κατεχολαμινεργικών νευρώνων στη νόσο Πάρκινσον.

Μια σειρά από επιπρόσθετα στοιχεία συνηγορούν υπέρ της συγκεκριμένης θεωρίας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν αδιάλυτα ολιγομερή σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Πάρκινσον που φέρουν τον τριπλασιασμό του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης (Miller et al., 2004). Επίσης, η παρουσία της μετάλλαξης A30P επιταχύνει δραματικά τον αρχικό πολυμερισμό της πρωτεΐνης, ενώ καθυστερεί σημαντικά τη δημιουργία ώριμων ινιδιακών δομών (Conway et al., 2000b, Li et al., 2001,2002). Επιπροσθέτως, τα ολιγομερή αυτά σχηματίζουν δομές που προσομοιάζουν με πόρους και καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες (Volles and Lansbury 2002).

Εικόνα 6. Τα πρωτοϊνίδια και όχι οι πιο ώριμες συσσωματωμένες μορφές αποτελούν την τοξική μορφή της α -συνουκλεΐνης. Στοιχεία από μελέτες συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι τα σωματία Lewy δεν προκαλούν, αλλά αντίθετα προστατεύουν από νευροεκφυλισμό (Goldberg and Lansbury 2000).



Στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της τοξικότητας των ολιγομερών-πρωτοϊνιδίων είναι και τα ακόλουθα (Cookson 2005):

- Σε κυτταρικά μοντέλα, τοξικότητα εμφανίζεται χωρίς την παρουσία μεγάλων συσσωματώσεων της πρωτεΐνης (Xu et al., 2002)
- Ανιχνεύσιμες συσσωματώσεις και εναποθέσεις αδιάλυτων μορφών α-συνουκλεΐνης επισυμβαίνουν πολύ αργότερα από την έλευση του κυτταρικού θανάτου *in vitro* (Gosavi et al., 2002)
- Διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την ανθρώπινη αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη (WT) σε επίπεδα συγκρίσιμα με την ενδογενή πρωτεΐνη, ανέπτυξαν μη ινιδιακά ενδονευρωνικά έγκλειστα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (*SN pars compacta*) (Masliah et al., 2000)
- Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την WT και την A53T α-συνουκλεΐνη υπάρχει νευροεκφυλισμός χωρίς ινιδιακά έγκλειστα εκτός της μέλαινας ουσίας (van der Putten et al., 2000)
- Η έκφραση της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης με λεντοϊούς σε μέλαινα ουσία αρουραίου οδήγησε σε επιλεκτική ντοπαμινεργική τοξικότητα παρουσία μη ινιδιακών εγκλείστων (Lo Bianco et al., 2002)
- Τα έγκλειστα που περιέχουν α-συνουκλεΐνη σε κάποια ζωικά μοντέλα δεν περιέχουν ινίδια, ενώ παράλληλα σε μύγες στις οποίες δεν παρατηρείται νευροεκφυλισμός υπάρχουν ινιδιακά έγκλειστα (Auluck and Bonini 2002, Auluck et al., 2002)
- Σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης έχουν αναγνωριστεί σε νευρώνες σε μορφές άλλες εκτός των σωματίων Lewy (Irizarry et al., 1998, Galvin et al., 1999, Arima et al., 1998a, Braak et al., 1999, Crowther et al., 2000)

Ποιος είναι όμως ο μηχανισμός μέσω του οποίου η α-συνουκλεΐνη και συγκεκριμένα τα συσσωματώματα αυτής προκαλούν την τοξική τους δράση στα κύτταρα;

Η ανώμαλη αναδίπλωση της α-συνουκλεΐνης είναι δυνατόν να επάγει μηχανισμούς στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress), οι οποίοι αν δραστηριοποιηθούν υπέρμετρα, δημιουργούν μη αναστρέψιμες βλάβες και τελικά θάνατο των κυττάρων. Αυτός ο μηχανισμός έχει αναφερθεί ότι διεγείρεται από επαγόμενη έκφραση της μεταλλαγμένης μορφής A53T σε κύτταρα PC12. Επιπλέον, μία φαρμακευτική ουσία, η salubrinal, που αναστέλλει την υπέρμετρη αυτή αντίδραση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οδήγησε σε μείωση της τοξικής δράσης της A53T α-συνουκλεΐνης (Smith W.W. et al., 2005).

Πολύ σημαντική είναι και η έρευνα της Susan Linquist και συνεργατών, οι οποίοι χρησιμοποιώντας ένα σύστημα μυκήτων, παρατήρησαν ότι η έκφραση της α-συνουκλείνης οδηγεί σε πρώιμο πρόβλημα στη μεταφορά κυστιδίων και πρωτεϊνών μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi, με αποτέλεσμα την πρόκληση στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παράλληλα, ταυτοποίησαν μόρια τα οποία μεταβάλλουν την τοξικότητα της α-συνουκλείνης. Διαπίστωσαν, ότι έκφραση του μορίου Rab1 και άλλων πρωτεϊνών που επάγουν την επικοινωνία και μεταφορά κυστιδίων και πρωτεϊνών στον άξονα ενδοπλασματικό δίκτυο-Golgi προσέδωσε σημαντική προστατευτική δράση. Επιπλέον, η προστατευτική δράση του Rab1 έναντι της τοξικής δράσης της α-συνουκλείνης απεδείχθη και σε πρωτογενή ντοπαμινεργικά κυτταρικά συστήματα θηλαστικών, αλλά και στα μοντέλα σε μύγες και *C. Elegans* (McNaught K.S. et al., 2001).

Μια άλλη θεωρία για την τοξική δράση της α-συνουκλείνης είναι ότι δημιουργεί πρόβλημα στο σύστημα αποδόμησης πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα στο σύστημα ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System, UPS). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από δύο άλλα γονίδια στα οποία μεταλλάξεις προκαλούν οικογενή νόσο Πάρκινσον, τα γονίδια της Parkin και της UCH-L1, συμμετέχουν στο UPS (McNaught et al., 2001). Έχει πράγματι ανευρεθεί σε παθολογοανατομικό υλικό ασθενών με σποραδική νόσο Πάρκινσον, μειωμένη δραστηριότητα και έλλειψη συγκεκριμένων υποομάδων του πρωτεασώματος (McNaught et al., 2002, Tofaris G.K. et al, 2003). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι αναστολή του πρωτεασώματος σε ποικίλα κυτταρικά συστήματα οδηγεί στην δημιουργία συσσωματώσεων και εγκλείστων που προσομοιάζουν με σωμάτια Lewy, καθώς και σε κυτταρική εκφύλιση (Rideout, H. J et al., 2001, 2002, 2003, 2005, Dietrich P. et al., 2003, McNaught et al., 2002).

Στο εργαστήριό μας ανευρέθη ότι έκφραση της μεταλλαγμένης A53T μορφής της α-συνουκλείνης σε νευρωνικά κύτταρα οδηγεί σε πρωτεασωμική δυσλειτουργία (Stefanis L. et al., 2001). Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές, αν και δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία (Martin-Clemente B. et al., 2004, Petrucelli L. et al., 2002, Tanaka Y. et al., 2001). Ακόμη και η WT πρωτεΐνη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί πρωτεασωμική δυσλειτουργία σε μία μελέτη (Snyder et al., 2003). Στο εργαστήριό μας, έχουμε εξετάσει τον μηχανισμό μέσω του οποίου η α-συνουκλείνη προκαλεί αυτό το φαινόμενο, και έχουμε αποδείξει ότι ειδικές ενδιάμεσες διαλυτές ολιγομερείς μορφές σχετίζονται άμεσα με το πρωτεάσωμα και είναι υπεύθυνες για την αναστολή του (Emmanouilidou E. et al., 2008). Σε *in vitro* μελέτες σε δοκιμαστικούς σωλήνες έχει δειχθεί επίσης ότι η α-συνουκλείνη ενώνεται με υποομάδες του πρωτεασωμικού συμπλέγματος, και ότι οι ινιδιακές μορφές αναστέλλουν πολύ πιο έντονα την πρωτεασωμική λειτουργία σε

σχέση με την μονομερή μορφή (Snyder H. et al., 2003, Ghee M. et al., 2000, Lindersson E. et al., 2004).

Το άλλο μείζον σύστημα αποδόμησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών είναι το λυσόσωμα, όπου αποδομούνται ενδοκυττάρια πρωτεΐνες μέσω διαφόρων μηχανισμών αυτοφαγίας. Μεταλλαγμένες μορφές της α-συνουκλεΐνης προκαλούν έντονη διαταραχή και αυτού του συστήματος σε νευρωνικά κύτταρα (Cuervo AM. et al., 2004). Ο μηχανισμός εδώ φαίνεται να σχετίζεται με την επιλεκτική αναστολή του ειδικού αυτοφαγικού μονοπατιού της αυτοφαγίας μέσω σαπερονών (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA) (Vogiatzi T. et al., 2008).

Έχει επιχειρηθεί συσχέτιση της τοξικής δράσης της α-συνουκλεΐνης με την παρουσία ντοπαμίνης. Οι Xu και συνεργάτες (Xu J. et al., 2002), καθώς και οι Zhou και συνεργάτες (Zhou ZD. et al., 2006) παρατήρησαν ότι η τοξική της δράση της α-συνουκλεΐνης σε ντοπαμινεργικά κύτταρα εξαρτάται από την ύπαρξη ντοπαμίνης. Σε μία άλλη μελέτη πάντως, σημαντική αύξηση ντοπαμίνης δεν συνδυάστηκε με μεταβολή της τοξικής δράσης της α-συνουκλεΐνης, αν και οι διαλυτές oligομερείς μορφές αυξήθηκαν (Mazzulli JR. et al., 2006).

Πρόσφατα, η θεωρία της σημασίας της δημιουργίας πόρων έχει ενισχυθεί με την ανακάλυψη ότι *in vitro* η α-συνουκλεΐνη μπορεί να προκαλέσει άνοιγμα μικρών πόρων σε συναπτικά κυστίδια, δράση που επάγεται με τις μεταλλάξεις, ενώ οι μεταλλαγμένες μορφές οδηγούν σε αυξημένη διήθηση κατεχολαμινών από συναπτικά κυστίδια σε ντοπαμινεργικά κύτταρα, κάτι που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικών κατεχολαμινών, που με την σειρά τους επάγουν οξειδωτικό στρες (Mosharov EV. et al., 2006).

Μία ενδιαφέρουσα θεωρία για την τοξική δράση της α-συνουκλεΐνης θέτει ως ιδιαίτερα σημαντική την συσχέτισή της με το σύστημα των μικροσωληνίσκων και τον κυτταροσκελετό γενικότερα. Από παθολογοανατομικής απόψεως, δράση σε αυτό το σημείο θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί στη νόσο Πάρκινσον η παθολογική διεργασία φαίνεται να επηρεάζει πρωτίστως τους νευράξονες και σε ένα μετέπειτα στάδιο να επιδρά στο νευρωνικό σώμα. Η φυσιολογική α-συνουκλεΐνη υποβοηθά τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Alim MA. et al., 2004). Η παθολογική όμως πρωτεΐνη, μέσω άμεσης ή έμμεσης δράσης, φαίνεται να κατακερματίζει πολυμερισμένους μικροσωληνίσκους και να προκαλεί έτσι εκφυλισμό των νευραξόνων (Lee HJ. et al., 2006).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η α-συνουκλεΐνη σε υψηλά επίπεδα μπορεί να αναστέλλει μονοπάτια επιβίωσης, όπως της μεταβίβασης σήματος των κινασών ERK/MAP (Iwata A. et al., 2001) ή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 (Seo J. H. et al., 2002), ή να επάγει μονοπάτια κυτταρικού θανάτου, όπως την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax (Seo J. H. et al., 2002). Σε διαγονιδιακά ποντίκια

βρέθηκε ότι, εν μέρει τουλάχιστον, ο θάνατος λόγω έκφρασης της A53T α-συνουκλεΐνης είχε χαρακτηριστικά απόπτωσης, και συνοδευόταν από λειτουργικές και δομικές αλλαγές των μιτοχονδρίων, καθώς και επαγωγή της προαποπτωτικής πρωτεΐνης p53 (Martin LJ J. H. et al., 2006).

Διάφοροι φυσικοί και χημικοί παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία δημιουργίας συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης. Οι παράγοντες αυτοί καθώς και η ευοδωτική ή ανασταλτική δράση τους στη δημιουργία συσσωματώσεων αποδίδεται συνοπτικά στον πίνακα 3.

Οι μεταλλάξεις A53T και A30P επάγουν τη συσσωμάτωση της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης, ενώ η επίδραση της E46K παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, και οι δυο αυτές μεταλλάξεις έχουν διαφορετική δράση καθώς η A30P φαίνεται ότι σταθεροποιεί τις ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης, ενώ η A53T επάγει το σχηματισμό ινιδίων (Chandra et al. 2003, Davidson et al. 1998, Heiser et al. 2000).

Τα λιπαρά οξέα, τα ανιονικά απορρυπαντικά και τα ανιονικά λιπίδια είναι ισχυροί επαγωγείς του σχηματισμού ινιδίων α-συνουκλεΐνης. *In vivo* χρήση παρακουάτ και παρασιτοκτόνων σε τρωκτικά προκαλεί το σχηματισμό αναστρέψιμων εγκλείστων α-συνουκλεΐνης σε νευρικά κύτταρα. Ωστόσο, η τάση συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης σε αυτές τις δομές παραμένει άγνωστη. *In vitro*, τα εντομοκτόνα προκαλούν δομικές αλλαγές και επιταχύνουν το σχηματισμό ινιδίων α-συνουκλεΐνης (Sirover et al. 1999, Snyder et al. 2003).

Πίνακας 3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία συσσωματώσεων α-συνουκλεΐνης. Η επαγωγή σημειώνεται με +, ενώ η αναστολή της συσσωμάτωσης με -. (προσαρμογή από Lundvig et al. 2005)

Παράγοντας	Αποτέλεσμα στη συσσωμάτωση	Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν	Βιβλιογραφικές αναφορές
Φωσφορύλιωση στη θέση σερίνη 129 (Ser129)	+	(<i>in vitro</i> , διαγονιδιακά ποντίκια, μοντέλα με μύγες, ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις και φασματομετρία μάζας	(Kahle et al. 2000, Keck et al. 2003, Kayed et al. 2003)
Μεταλλάξεις παρερμήνευσης (A30P, A53T)	+		(Chandra et al. 2003, Davidson et al. 1998, Heiser et al. 2000)
Αύξηση Συγκέντρωσης	+	(ο τριπλασιασμός του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης προκαλεί άνοια με σωματίδια Lewy και νόσο Parkinson με αυτόσωμο, επικρατούντα τρόπο.	(Baba et al. 1998)
Μείωση pH	+		(Lin et al. 2004, Lindersson 2004)
Αύξηση Φορτίου ιόντων	+		(Lin et al. 2004)
Αύξηση Θερμοκρασίας	+		(Lindersson 2004)
Κατατμήσεις του C-άκρου	+	(ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη)	(Lindersson 2004, Hoyer et al. 2002)
Οξειδωτικές τροποποιήσεις	+	(έγκλειστα από συνουκλεϊνοπάθειες, νιτροσυλίωση)	(Murray et al. 2003, Narshi et al. 1999, Paik et al. 1997)
Μέταλλα	+/-	(<i>in vitro</i> . Ανάμεσά σε εκείνα που δρουν επαγωγικά: Al ⁺³ , Fe ⁺³ , Co ⁺³ , Mn ⁺² , Ca ⁺² και Cu ⁺²)	(Manning-Bog et al. 2002, McNaught et al. 2003, Cyr et al. 2002, Masliah 2000)
Ανθρώπινη β-/γ-συνουκλεΐνη	-	(<i>in vitro</i>)	(Paik et al. 1999, Papp et al. 1989)
Τουμπουλίνη	+/-	(<i>in vitro</i>)	(Pountney 2004, Saito et al. 2003)
Ιστόνες, p25α, Tau	+	(<i>in vitro</i>)	(Perrin et al. 2001, Polymeropoulos et al. 1997)
Λιπίδια	+		(Serpell et al. 2000, Sharon et al. 2003, Shtilerman et al. 2002, Singleton et al. 2004)
Εντομοκτόνα	+	(<i>in vivo</i> σε τρωκτικά)	(Sirover et al. 1999, Snyder et al. 2003)

2.2.2.4. Ανάπτυξη δυνητικά νευροπροστατευτικών θεραπειών με βάση την τροποποίηση της συσσωμάτωσης της α-συνουκλείνης

Οι υπάρχουσες θεραπείες που αφορούν τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα είναι μόνο συμπτωματικές· καμία από αυτές δεν αποτρέπει ή δεν αναστέλλει την πορεία της νόσου και τον εκφυλισμό των νευρώνων. Τροχοπέδη στην ανάπτυξη νευροπροστατευτικών θεραπειών αποτελεί η περιορισμένη κατανόηση γεγονότων-κλειδιών που προάγουν το νευροεκφυλισμό. Επιπλέον, οι συνουκλείνοπάθειες είναι πολυπαραγοντικές νόσοι. Ωστόσο, οι περισσότερες, αν όχι όλες, σχετίζονται με βλάβες στην λειτουργία και τη διαδικασία συσσωμάτωσης της α-συνουκλείνης.

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαν να αναπτυχθούν αποτελεσματικά θεραπευτικά πρωτόκολλα, βασιζόμενα στη λεπτομερή ανάλυση της λειτουργίας, δυσλειτουργίας και συσσωμάτωσης της α-συνουκλείνης. Η ταυτοποίηση μορίων που παρεμποδίζουν την εναπόθεση πρωτεϊνών ή και αναστρέφουν τη δημιουργία ολιγομερών-ινιδίων αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας των εγκλείστων σε ανθρώπινες νόσους. Πρόσφατες μελέτες όπου διαφαίνεται ο ανασταλτικός ρόλος ή ακόμη και η αναστροφή της ινιδιοποίησης της α-συνουκλείνης από ορισμένα μικρά μόρια, αποτελούν το πρώτο βήμα για μελλοντικές ανακαλύψεις σε αυτό τον τομέα.

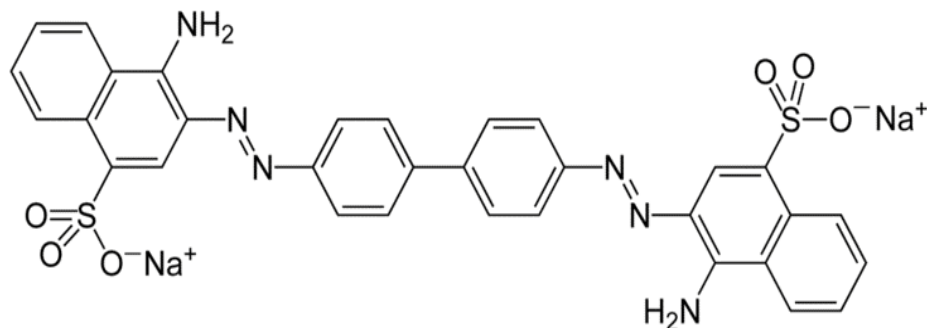
Υπάρχει ωστόσο μια επιφύλαξη ως προς τη χρησιμοποίηση τέτοιων φαρμάκων που προάγουν την αναστολή της συσσωμάτωσης ή και τη διάσπαση των ήδη σχηματισμένων ινιδίων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα πρωτοϊνίδια διαθέτουν ισχυρές νευροτοξικές ιδιότητες. Επομένως, η αναστολή της διαδικασίας σχηματισμού ινιδίων σε πρώιμα στάδια με την επακόλουθη παραγωγή μικρών ολιγομερών, μπορεί να αποβεί περισσότερο καταστροφική παρά ωφέλιμη. Τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η έρευνα για το ιδανικό φάρμακο για τις συνουκλείνοπάθειες θα πρέπει να στραφεί προς την ανακάλυψη μορίων που δρουν είτε σταθεροποιώντας τη φυσιολογική μη αναδιπλούμενη δομή της α-συνουκλείνης ή μπλοκάροντας ολοκληρωτικά τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης.

Εναλλακτικά, υπάρχει μια άλλη προσέγγιση που βασίζεται στο δυνητικό νευροπροστατευτικό ρόλο των μεγάλων εγκλείστων· τα ενδονευρωνικά αυτά εγκλείστα θα περιέχουν τοξικές μορφές ανώμαλα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών (Bodner et al., 2006 a,b). Η έρευνα στρέφεται προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης χημικών παραγόντων που επάγουν τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματώσεων, επιταχύνουν το σχηματισμό μεγάλων εγκλείστων και ελαχιστοποιούν τα τοξικά αποτελέσματα των ανώμαλα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών.

2.2.2.5. Το Congo red και η δράση του στη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών νόσων

Το Congo red ανακαλύφθηκε το 1884, από το γερμανό χημικό Paul Böttiger για χρήση ως δείκτης του pH. Σήμερα, αποτελεί έναν από τους πλέον γνωστούς ιστολογικούς δείκτες και χρησιμοποιείται για τη χρώση των εναποθέσεων αμυλοειδούς στους ιστούς. Το Congo red εισέρχεται σε ορισμένα είδη κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού όπως τα κύτταρα Kupffer του ήπατος, σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και αποβάλλεται μέσω της εντερικής οδού καθώς και από το ουροποιογεννητικό σύστημα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η διαπερατότητά του διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι περιορισμένη λόγω του μοριακού του μεγέθους και του ηλεκτροστατικού του φορτίου. Είναι δυνητικά τοξικό· προκαλεί ελάττωση πρωτεϊνών του ορού, θρομβοκυτταροπενία, μικροεμβολισμούς, ενώ έχει ενοχοποιηθεί και για καρκινογένεσεις (κυρίως ηπατοκυτταρικό και καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης). Τέλος, έχει καταδειχθεί με πειραματικές μεθόδους ότι διαθέτει και τερατογόνους ιδιότητες. Η χημική δομή του μορίου του Congo red φαίνεται στην εικόνα 7.

Εικόνα 7. Χημική δομή του μορίου του Congo Red



Το Congo red παρουσιάζει εκλεκτική δεσμευτική ικανότητα με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε νευροεκφυλιστικές νόσους, εμποδίζοντας έτσι τη δημιουργία συσσωματώσεων που ενοχοποιούνται για την παθογένεια αυτών των νόσων. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η δράση του στην εναπόθεση αμυλοειδούς στη νόσο Αλτσχάιμερ, στη συσσωμάτωση της huntingtin στη νόσο του Huntington και στις νόσους από πρωτεΐνες prion.

Το Congo red παρουσιάζει υψηλή δεσμευτική συγγένεια για την α-συνουκλειΐνη. Ωστόσο, αν και είναι γνωστό ότι εμποδίζει το σχηματισμό ινιδίων α-συνουκλειΐνης (Masuda et al., 2006) καθώς και το σχηματισμό πόρων (Azimova and Kagan,

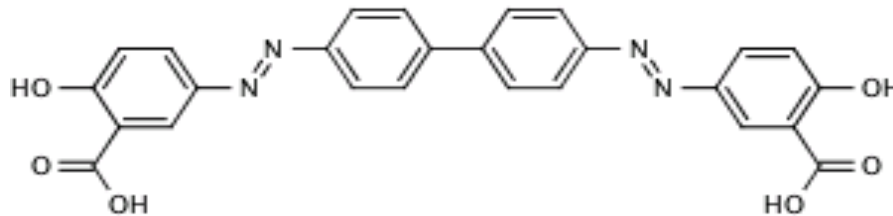
2003), τα αποτελέσματα της χρήσης του σε ζωικά μοντέλα της νόσου Πάρκινσον δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως.

2.2.2.6. Η Chrysamine G και η χρήση της στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων

Η Chrysamine G είναι το πλέον μελετημένο χημικό ανάλογο του Congo red (Εικόνα 8). Έχει μικρότερο μέγεθος και είναι περισσότερο λιπόφιλο, ιδιότητες που της επιτρέπουν τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επιπλέον, είναι λιγότερο τοξική από το Congo red, ενώ η δεσμευτική της συγγένεια προς το αμυλοειδές είναι πολύ μεγαλύτερη.

Σε *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες εγκεφαλικών κυττάρων από έμβρυα ποντικού που επωάστηκαν με αμυλοειδές β, προσθήκη της Chrysamine G ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αύξησε την επιβίωση των κυττάρων. Το αποτέλεσμα της δράσης της ήταν δόσοεξαρτώμενο και πιθανολογείται ότι οφείλεται στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. (Ishii et al., 2002)

Εικόνα 8. Χημική δομή του μορίου της Chrysamine-G



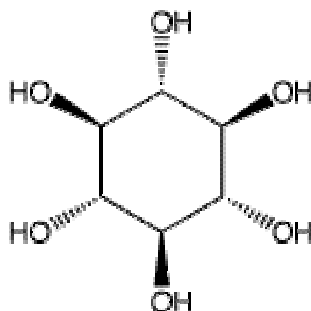
2.2.2.7. Ιδιότητες της scyllo-inositol και χρήση της στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων

Η ινοσιτόλη είναι μια απλή πολυόλη με οκτώ φυσικά στερεοϊσομερή, από τα οποία τα πιο κοινά συναντώμενα στη φύση είναι η myo-, chiro-, epi- και scyllo-inositol. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ινοσιτόλης στο σώμα, με περίπου 5mM myo-inositol και 0,5mM scyllo-inositol. Συντίθεται είτε *in situ* από τη γλυκόζη, είτε μεταφέρεται από τον ορό διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Εισέρχεται στον εγκέφαλο με παθητική διάχυση, ή με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων (SMIT-1) που εκφράζονται στο χοριοειδές πλέγμα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι τα μοναδικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα που μπορούν να παράγουν ινοσιτόλη.

Η *scyllo-inositol* (ονομάζεται και *scyllo-cyclohexanehexol*) έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια ως δυνητική θεραπεία στη νόσο Αλτσχάιμερ. Παρουσιάζει ορισμένες ιδιότητες που την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική ως πιθανή θεραπευτική ουσία. Συγκεκριμένα, είναι μια μικρή ουσία που υπάρχει διαθέσιμη σε μορφή *peros*, η τοξικότητά της *in vivo* στις μέχρι στιγμής μελέτες εμφανίζεται μηδαμινή, ενώ είναι διαλυτή και διαπερνά εξαιρετικά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Townsend et al., 2006).

Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε η *scyllo-inositol* (Εικόνα 9), τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα κατέδειξαν ότι *in vitro* υπάρχει αναστολή του σχηματισμού ινιδίων Αβ42 ολιγομερούς και σταθεροποίηση ενός μικρότερου ολιγομερούς μορίου που δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα (McLaurin et al., 2000). Αντίστοιχα, *in vivo* στοιχεία υποδεικνύουν μια μείωση των διαλυτών υψηλού μοριακού βάρους ολιγομερών με μια συνακόλουθη αύξηση των μονομερών β αμυλοειδούς καθώς και των τριμερών μορφών τους (McLaurin et al., 2006).

Εικόνα 9. Χημική δομή του μορίου της *scyllo-inositol*



3. Αντικειμενικοί σκοποί της εργασίας

3.1. Διερεύνηση της τοξικότητας της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται από τα κύτταρα με άγνωστο μηχανισμό. Σε μια σειρά από πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, έχει καταδειχθεί ότι *in vivo* και *in vitro*, η παρουσία τόσο της μονομερούς όσο και των συσσωματωμένων-ολιγομερών μορφών της πρωτεΐνης σε εξωκυτάρια υγρά. Έχει επίσης καταδειχθεί η τοξικότητα των ινιδιακών μορφών της α-συνουκλεΐνης (Bodles et al., 2000, El-Agnaf et al., 1998) καθώς και των πρωτοϊνιδίων (Du et al., 2003).

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για το μηχανισμό της τοξικότητας της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης. Ένα από αυτά προτείνει το σχηματισμό κυλινδρικών δομών που προσομοιάζουν με πόρους και προσδένονται στις κυτταρικές μεμβράνες, επιτρέποντας την ελεύθερη ανταλλαγή ιόντων και μικρών μεταβολιτών μεταξύ κυτταροπλάσματος και εξωκυττάριου χώρου και οδηγώντας έτσι σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Volles and Lansbury 2003). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός νευροτοξικότητας, εμπλέκει την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων από τα συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης και την επακόλουθη απελευθέρωση παραγόντων της φλεγμονής με αποτέλεσμα καταστροφή ντοπαμινεργικών νευρώνων (Zhang et al., 2005).

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να αποδειχθεί ότι η φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη και συγκεκριμένα οι συσσωματωμένες μορφές της, είναι τοξικές όταν γίνει προσθήκη τους σε κυτταρικές σειρές από ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος.

3.2. Χρήση των χημικών ουσιών *Chrysamine G*, *Congo red*, *Scyllo-inositol* και η επίδρασή τους στην τοξικότητα της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Η μετατροπή ενός αριθμού διαλυτών πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε ινιδιακές μορφές, όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί κεντρικό γεγονός στην παθογένεση των πιο κοινών νευροεκφυλιστικών νόσων. Συνεπώς, πολλές από τις πρόσφατες στρατηγικές νευροπροστασίας στοχεύουν στην αναστολή της δημιουργίας τέτοιων ινιδίων καθώς και στην διάλυση των ήδη σχηματισθέντων. Οι ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν αντισώματα, συνθετικά πεπτίδια, μοριακές σαπερόνες και άλλους χημικούς αναστολείς. Ανάμεσά τους και μικρά οργανικά μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε τέτοιες έρευνες *in vitro*. Κυρίως όμως οι έως τώρα εργασίες αφορούν την εναπόθεση β αμυλοειδούς, την πρωτεΐνη prion, τη συσσωμάτωση της huntingtin και πιο πρόσφατα το σχηματισμό ινιδίων tau πρωτεΐνης που επάγεται από την ηπαρίνη. Πολύ λίγα στοιχεία υπάρχουν σχετικά με την αναστολή σχηματισμού ινιδίων της α-συνουκλεΐνης.

Ο επόμενος στόχος της παρούσας εργασίας, είναι να αναδείξουμε την πιθανή δράση των συγκεκριμένων χημικών ρυθμιστών (*Congo red*, *Chrysamine G*, *scyllo-inositol*) στην τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης. Ξεκινώντας από την παραδοχή ότι οι ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης είναι εκείνες που ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τη νευροτοξικότητα, καθώς και από την ήδη γνωστή και αποδεδειγμένη ιδιότητα των συγκεκριμένων χημικών ουσιών να αναστέλλουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών ολιγομερών, θα διερευνήσουμε τυχόν

νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα στην επιβίωση των κυττάρων κατά την ταυτόχρονη προσθήκη των αναστολέων αυτών μαζί με ολιγομερή της α-συνουκλείνης.

4. Πειραματικές διαδικασίες-Υλικά και μέθοδοι

4.1. Κυτταρικές καλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, SHSY-5Y. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από κλωνοποίηση της κυτταρικής σειράς SK-N-SH, που δημιουργήθηκε από ένα μεταστατικό οστικό καρκίνο, το 1970. Είναι ιδιοκτησία του Memorial Sloan-Kettering Cancer Center της Νέας Υόρκης, και διανέμονται μόνο για σκοπούς ακαδημαϊκής έρευνας, και κατόπιν σύμφωνης γνώμης του εν λόγω κέντρου.

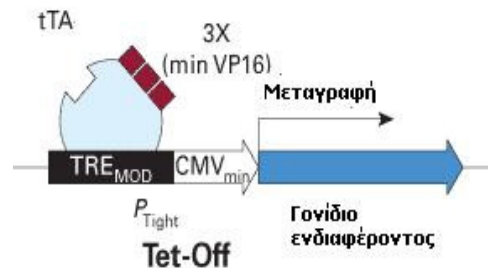
Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν ενδογενώς χαμηλά επίπεδα α-συνουκλείνης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν SHSY-5Y κύτταρα στα οποία γίνεται επαγωγή της έκφρασης της αγρίου τύπου α-συνουκλείνης απουσία δοξουκυκλίνης (WT- κύτταρα) μέσω του συστήματος TET-Off (Clontech) (Εικόνα 10). Ως ιδανικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της ίδιας σειράς στα οποία η έκφραση του γονιδίου της α-συνουκλείνης διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα παρουσία δοξουκυκλίνης σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml (WT+ κύτταρα).

SHSY-5Y κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται μια βακτηριακή πρωτεΐνη, η β-γαλακτοσιδάση (β-gal) μέσω αντίστοιχου TET-Off μηχανισμού, χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως μάρτυρες.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία από πολυστυρένιο (Orange), διαμέτρου 10 cm με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Invitrogen) το οποίο περιείχε 100 ml/l εμβρυϊκό βόειο ορό (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-γλουταμίνη (Sigma), 10.000 μονάδες/ml πενικιλίνη (Sigma), και 10.000 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη (Sigma).

Ειδικά για τα SHSY-5Y κύτταρα που φέρουν το σύστημα TET-Off, το θρεπτικό υλικό περιείχε επίσης τα αντιβιοτικά G418 (Invitrogen) και υγρομυκίνη-B (Invitrogen) σε συγκεντρώσεις 250 µg/ml και 50 µg/ml, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας Clontech, η έναρξη της προσθήκης των δυο αυτών φαρμάκων στο θρεπτικό υλικό, πρέπει να γίνεται μετά από παραμονή των κυττάρων σε καλλιέργεια για 48-72 ώρες. Παράλληλα, για τα WT+ κύτταρα γινόταν προσθήκη δοξουκυκλίνης σε συγκέντρωση 0,5µg/ml σε παρήμερο σχήμα.

Εικόνα 10. Το σύστημα TET-off. Η περιοχή VP16 (από ερπητοϊό) μετατρέπει την πρωτεΐνη TETR (από E.coli) από αναστολέα σε ενεργοποιητή της μεταγραφής, παράγοντας την υβριδική πρωτεΐνη tTA. Στο σύστημα TET-off, η tTA προσδένεται στην περιοχή TRE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή απουσία τετρακυκλίνης ή δοξυκυκλίνης. Η περιοχή TRE, αποτελεί συστατικό του πλασμιδίου απόκρισης pTRE που εκφράζει το γονίδιο ενδιαφέροντος. Και στα δυο συστήματα, η μεταγραφή ρυθμίζεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, σε απόκριση στη δοξυκυκλίνη (προσαρμογή από manual της Clontech, 2008).



Η διαφοροποίηση των SHSY-5Y κυττάρων έγινε με προσθήκη 10 μ M all-trans ρετινοϊκού οξέως (Merck) για τουλάχιστον 5 ημέρες.

Όλα τα κύτταρα παρέμειναν σε θάλαμο υγρής επώασης, σε θερμοκρασία 37°C και με ατμόσφαιρα CO₂ 5%. Γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε δύο μέρες.

4.2. Συλλογή θρεπτικού υλικού (CM)-Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων

Προκειμένου να γίνει συλλογή του θρεπτικού υλικού (conditioned medium, CM) που περιέχει την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, τα WT+ και WT- SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργούνταν σε τρυβλία από πολυστυρένιο, διαμέτρου 140 mm. Όταν η περιεκτικότητα του τρυβλίου σε κύτταρα έφθανε στο 70-80%, γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με νέο που περιείχε 20 ml/l FBS. Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37°C, θρεπτικό μέσο (CM) και κύτταρα συλλέγονταν. Το CM φυγοκεντρούνταν στις 4000xg για 10 λεπτά στους 4°C για απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων ή τυχόν υπολειμμάτων τους και κατόπιν φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

Όσον αφορά στη συλλογή των αντίστοιχων κυττάρων, τα κύτταρα απομακρύνονταν με μηχανικό τρόπο σε κρύο διάλυμα PBS και συλλέγονταν μετά από φυγοκέντρηση σε 200xg για 5 λεπτά. Μετά από μία επιπλέον πλύση με κρύο διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση σε 1300xg για 5 λεπτά στους 4°C, τα κύτταρα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη λύση τους.

Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος που περιέχει 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl με pH 7,6, 0,1% SDS, 1% NP-40 και 2 mM EDTA, και επώαση σε πάγο για τουλάχιστον 10 λεπτά. Για την παραλαβή των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13800xg για 5 λεπτά στους 4°C. Αφού γίνει προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Biorad), το υπερκείμενο φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση τους.

Η συμπύκνωση του CM έγινε με τη μέθοδο της υπερδιήθησης. Γενικά κατά την υπερδιήθηση, τα μόρια του διαλύματος αναγκάζονται να διαπεράσουν μια πορώδη μεμβράνη λόγω της πίεσης που ασκείται στο διάλυμα μέσω της φυγοκέντρησης. Μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από εκείνο των πόρων κατακρατούνται στην επιφάνεια της μεμβράνης ενώ μόρια μικρότερου μεγέθους διαπερνούν την μεμβράνη. Συγκεκριμένα, για την συμπύκνωση του CM χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες στήλες Amicon Ultra 5K (Millipore). Μετά την προσθήκη του CM στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000xg στους 4°C μέχρι μείωσης του αρχικού όγκου 35-40 φορές.

Ακολούθως, γίνεται προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και το συμπυκνωμένο CM φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση του.

4.3. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ακολούθως, εφαρμόζεται ανοσοαποτύπωση κατά Western για το θρεπτικό υλικό και τα αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο από το εγχειρίδιο «Molecular cloning: A laboratory manual» (Tom Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Μετά από αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% -δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE). Ακολούθησε ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran 0,45 μM, Schleider Schuel) σε σταθερή τάση 400 mA για 2 ώρες, σε διάλυμα μεταφοράς με σύσταση 150 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ελέγχεται με χρώση της μεμβράνης σε διάλυμα χρωστικής Ponceau-S σε οξικό οξύ.

Η σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης στους 4°C για 16 ώρες παρουσία του αντισώματος. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: πολυκλωνικό αντίσωμα από κόνικλο έναντι της α-συνουκλεΐνης (C-20: sc-7011, Santa Cruz) σε αραιώση 1:1000,

μονοκλωνικό αντίσωμα από επίμου (BD, Santa Cruz) σε τελική αραιώση 1:1000, μονοκλωνικό αντίσωμα από επίμου κατά της ουμπικουΐτινης (Chemicon), σε τελική αραιώση 1:1000, μονοκλωνικό αντίσωμα από επίμου, ERK 2 (D 2: sc-1647, Santa Cruz) σε τελική αραιώση 1:5000), μονοκλωνικό αντίσωμα από επίμου, κατά της πρωτεΐνης BSA (Bovine serum albumin: αλβουμίνη του βόειου ορού), (HYB 267-01, AntibodyShop).

Η σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος γίνεται με επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση του αγριοραπανιού (horseradish peroxidase, HRP) το οποίο επιτρέπει την χημειοφωταυγή ανίχνευση των πρωτεϊνών παρουσία του υποστρώματος ECL. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται μετά από έκθεση της μεμβράνης σε ακτινολογικό φιλμ.

Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε διάλυμα TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20) που περιείχε 5% άπαχο γάλα για την αποφυγή μη ειδικής δέσμευσης. Όλες οι εκπλύσεις της μεμβράνης έγιναν σε διάλυμα TBS-T.

Η επανασήμανση με νέο πρωτογενές αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου-γλυκίνης (0,5 M NaCl, 0,2 M γλυκίνη, pH 2,8) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από έκπλυση της μεμβράνης σε διάλυμα TBS-T, ακολουθεί σήμανση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός της α-συνουκλεΐνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε μετά από τη συλλογή-συμπύκνωση του θρεπτικού υλικού και την ομογενοποίηση των αντίστοιχων κυττάρων.

Μετά από τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, ορισμένη ποσότητα του συμπυκνωμένου θρεπτικού υλικού και του κυτταρικού εκχυλίσματος αναλύεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, στο ίδιο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αναλύονται παράλληλα δείγματα ανθρώπινης ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης (Chemicon) σε συγκεντρώσεις από 2,5 ng έως 20 ng. Οι ζώνες που προκύπτουν πυκνομετρούνται με τη βοήθεια του λογισμικού Gel Analyzer (Biosure Greece).

4.5. Μικροσκοπία

Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με μικροσκοπία φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε ανεστραμμένο μικροσκόπιο Leica DMIRBE2 (Leica Microsystems CMS GmbH) με 20X αντικειμενικό φακό. Η λήψη των ψηφιακών φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Leica Application Suite (LAS), με τη βοήθεια του λογισμικού LAS (Version 2.8.1, Build 1554) (Leica Microsystems CMS GmbH).

4.6. Μέτρηση κυτταροτοξικότητας

Για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit (Invitrogen) σύμφωνα με το οποίο η διάκριση των νεκρών κυττάρων γίνεται μέσω χρώσης τους με την χρωστική ομοδιμερές του αιθιδίου (Ethidium homodimer, Eth-1).

Πιο αναλυτικά, τα SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διαφοροποιήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων. Μετά τη διαφοροποίησή τους, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C με το θρεπτικό υλικό που είχε συλλεχθεί από κύτταρα β-gal-, WT+, και WT-. Η διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας του θρεπτικού υλικού περιγράφηκε στην παράγραφο 4.2.

Ακολουθεί ταυτόχρονη χρώση των νεκρών κυττάρων και των πυρήνων με τις χρωστικές Eth-1 (σε αραιώση 1:2000) και Hoechst (σε συγκέντρωση 1 µg/ml, Sigma), αντίστοιχα. Οι χρωστικές αραιώνονται με απλό θρεπτικό μέσο. Η χρώση γίνεται για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά από έκπλυση με απλό θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα αναλύονται με μικροσκοπία φθορισμού μέσω του λογισμικού LAS. Οι ψηφιακές φωτογραφίες αναλύθηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια του λογισμικού Image J.

Η κυτταροτοξικότητα σε κάθε συνθήκη εκφράζεται ως το % ποσοστό του αριθμού των νεκρών κυττάρων (χρώση Eth-1) προς τον αριθμό του συνόλου των κυττάρων (χρώση Hoechst) σε ένα πεδίο. Τα πεδία επιλέχθηκαν τυχαία και ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν ανά πεδίο ήταν 100 κύτταρα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Origin (Microcal Software, Inc).

4.7. Επεξεργασία ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης για το σχηματισμό συσσωματωμάτων και χρήση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol

Η δυνατότητα των χημικών ουσιών, Congo red (CR, Sigma), Chrysamine G (CG, Sigma), και σκυλλο-ινοσιτόλης (*scyllo*-inositol, SI, Sigma) να διασπούν ή να εμποδίζουν το σχηματισμό των συσσωμάτων της α-συνουκλεΐνης ελέγχθηκε με χρήση των ουσιών αυτών σε διαλύματα ανθρώπινης ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης (Chemicon).

Συγκεκριμένα, διαλύματα ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης 1 mg/ml επώαστηκαν για 4 μέρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση απουσία ή παρουσία CR, CG ή SI σε συγκεντρώσεις 5, 50, 100, 500 μM για τα CR, CG και 1, 5, 25 μM για την SI. Μετά το τέλος της επώασης, 50 ng κάθε δείγματος αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

5. Αποτελέσματα

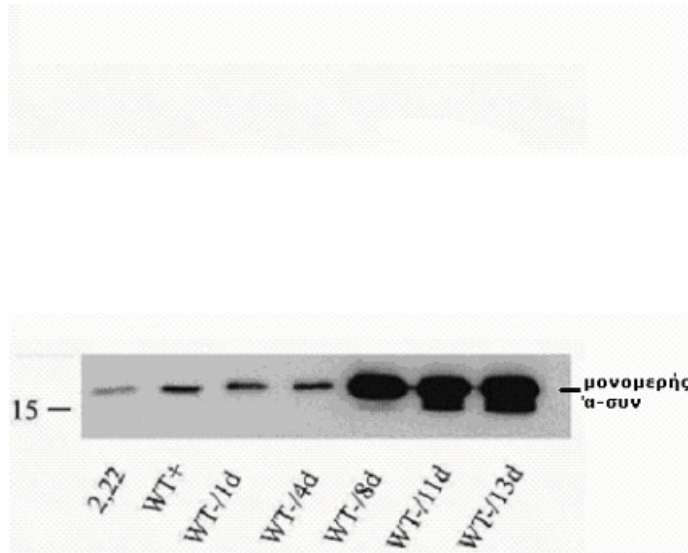
5.1. Έκκριση της α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό υλικό

Η α-συνουκλεΐνη θεωρούνταν αποκλειστικά ενδοκυττάρια πρωτεΐνη λόγω του ότι δε διαθέτει αλληλουχία πρόσδεσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι εντοπίζεται αποκλειστικά στο εσωτερικό νευρωνικών, καθώς και άλλων τύπων κυττάρων όπως αιμοπετάλια, κύτταρα γλοίας και άλλα (Clayton D. F. et al., 1998, Clayton D. F. et al., 1999, Mori F. et al., 2002, Park S. M. Et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία της α-συνουκλεΐνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα τόσο σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον όσο και σε υγιείς μάρτυρες (Borghì et al.2000, El-Agnaf et al.2003, Miller et al. 2004). Επιπλέον, η α-συνουκλεΐνη έχει βρεθεί να εκκρίνεται με άγνωστο, μέχρι στιγμής, μηχανισμό στο θρεπτικό μέσο νευρώνων και ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος τα οποία υπερεκφράζουν την α-συνουκλεΐνη (El-Agnaf et al., 2003, Lee et al., 2005, Sung et al., 2005).

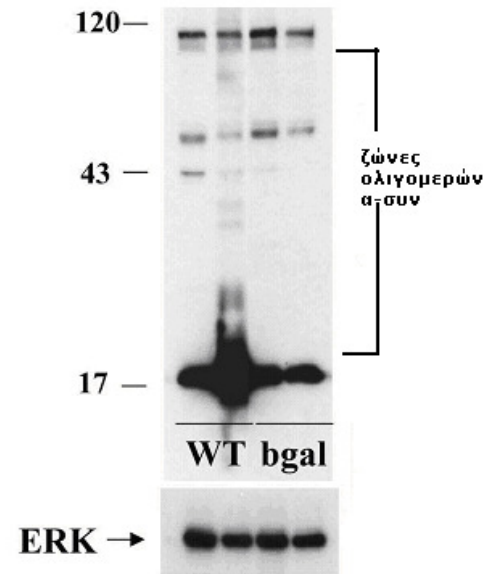
Το δικό μας σύστημα αποτελείται από ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY-5Y τα οποία υπερεκφράζουν μέσω συστήματος TET-Off την αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη απουσία δοξυκυκλίνης (WT- κύτταρα). Παρουσία δοξυκυκλίνης η έκφραση της α-συνουκλεΐνης παραμένει σε χαμηλά επίπεδα (WT+ κύτταρα), σχεδόν παρόμοια με τα επίπεδα ενδογενούς έκφρασης της μητρικής σειράς SHSY-5Y κυττάρων.

Για να διαπιστώσουμε το ρυθμό επαγωγής της α-συνουκλεΐνης, WT- κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία δοξυκυκλίνης για 1, 4, 8, και 11 ημέρες. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και τα ομογενοποιημένα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 11α, η παραγόμενη α-συνουκλεΐνη εκφράζεται σε μέγιστο βαθμό μετά από 8 ημέρες καλλιέργειας απουσία δοξυκυκλίνης. Πιο λεπτομερής ανάλυση των εκχυλισμάτων οδηγεί σε παρόμοια συμπεράσματα και για τις ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης.

Εικόνα 11. Έκφραση της α-συνουκλεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα. (11α). Western blot όπου απεικονίζεται η έκφραση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα με την πάροδο των ημερών. Απεικονίζεται η επαγωγή του μονομερούς της α-συνουκλεΐνης μετά από πάροδο 1, 4, 8, 11 και 13 ημερών. (2,22: μητρική σειρά SHSY-5Y κυττάρων) Στην εικόνα 11β απεικονίζονται τα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης. Τα β-gal κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 μέρες, παρουσία ή απουσία δοξυκυκλίνης και στη συνέχεια έγινε λύση τους και ανοσοαποτύπωση κατά western. (Παραχώρηση εικόνας από Βερέλλη Κ. και Εμμανουηλίδου Ε.).



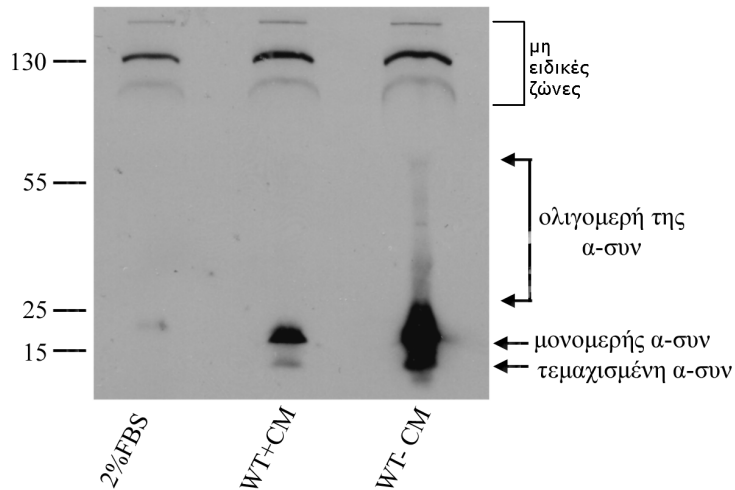
Εικόνα 11α.



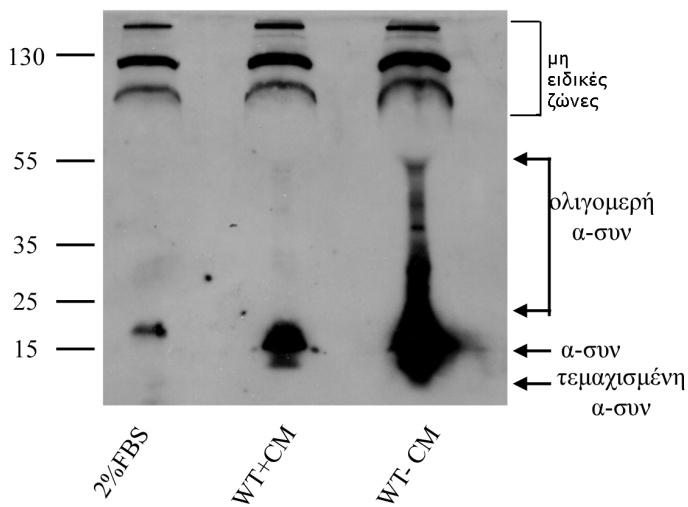
Εικόνα 11β.

Για να διερευνήσουμε την έκκριση της α-συνουκλεΐνης στο δικό μας σύστημα, τα WT+ και WT- κύτταρα καλλιεργήθηκαν για τουλάχιστον 8 ημέρες παρουσία και απουσία δοξυκυκλίνης, αντίστοιχα. Μετά από καλλιέργεια για 2 ημέρες, το θρεπτικό υλικό (conditioned medium, CM), συλλέχθηκε, συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την παρουσία α-συνουκλεΐνης. Η α-συνουκλεΐνη βρέθηκε να εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο των WT- κυττάρων (Εικόνα 13Α). Λεπτομερέστερη ανάλυση αποκάλυψε ότι όχι μόνο η μονομερής μορφή αλλά και οι ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης εκκρίνονται φυσιολογικά (δηλαδή χωρίς ιδιαίτερη διέγερση) στο θρεπτικό μέσο των SHSY-5Y κυττάρων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη (Εικόνα 13Β). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα του CM σε FBS είναι 20 ml/l, συγκέντρωση που επιτρέπει την συμπύκνωση του CM με τη μέθοδο της υπερδιήθησης.

Εικόνα 13. Έκκριση της α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό υλικό. Western blot όπου απεικονίζεται η μονομερής μορφή και τα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης (α-συν) που εκκρίνονται στο θρεπτικό υλικό (CM) από SHSY-5Y κύτταρα. 2% FBS: θρεπτικό υλικό με 2% FBS, θρεπτικό υλικό από WT+dox (WT+CM) και από WT-dox (WT-CM) κύτταρα. Χαμηλής έκθεσης φιλμ (1 λεπτό, Εικόνα 13α.), όπου απεικονίζεται καλύτερα η μονομερής α-συν και υψηλότερης έκθεσης φιλμ (10 λεπτά, Εικόνα 13β.), όπου απεικονίζονται καλύτερα τα ολιγομερή της α-συν.



Εικόνα
13α.



Εικόνα
13β.

5.2. Επίδραση της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης σε διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η α-συνουκλεΐνη είναι κυτταροτοξική και η τοξικότητά της αυτή έχει αποδοθεί στις ινιδιακές μορφές της (Bodles et al., 2000, El-Agnaf et al., 1998) καθώς και στα πρωτοϊνίδια (Du et al., 2003). Ορισμένοι πιθανοί μηχανισμοί δράσης με τους οποίους οι συγκεκριμένες μορφές της πρωτεΐνης επάγουν τον εκφυλισμό και τελικά τον κυτταρικό θάνατο, αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.2.2.4. και αφορούν α) την πρόκληση στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, β) την παρεμπόδιση της επικοινωνίας και μεταφοράς κυστιδίων και πρωτεϊνών στον άξονα ενδοπλασματικό δίκτυο-Golgi, γ) την προσβολή του συστήματος αποδόμησης πρωτεϊνών τόσο σε επίπεδο πρωτεασώματος όσο και σε επίπεδο λυσοσώματος, δ) τη δημιουργία μικρών πόρων στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την αυξημένη διήθηση κατεχολαμινών, ε) την προσβολή του κυτταροσκελετού σε επίπεδο μικροσωληνίσκων καθώς και στ) την προσβολή κυτταρικών μονοπατιών μεταβίβασης σήματος.

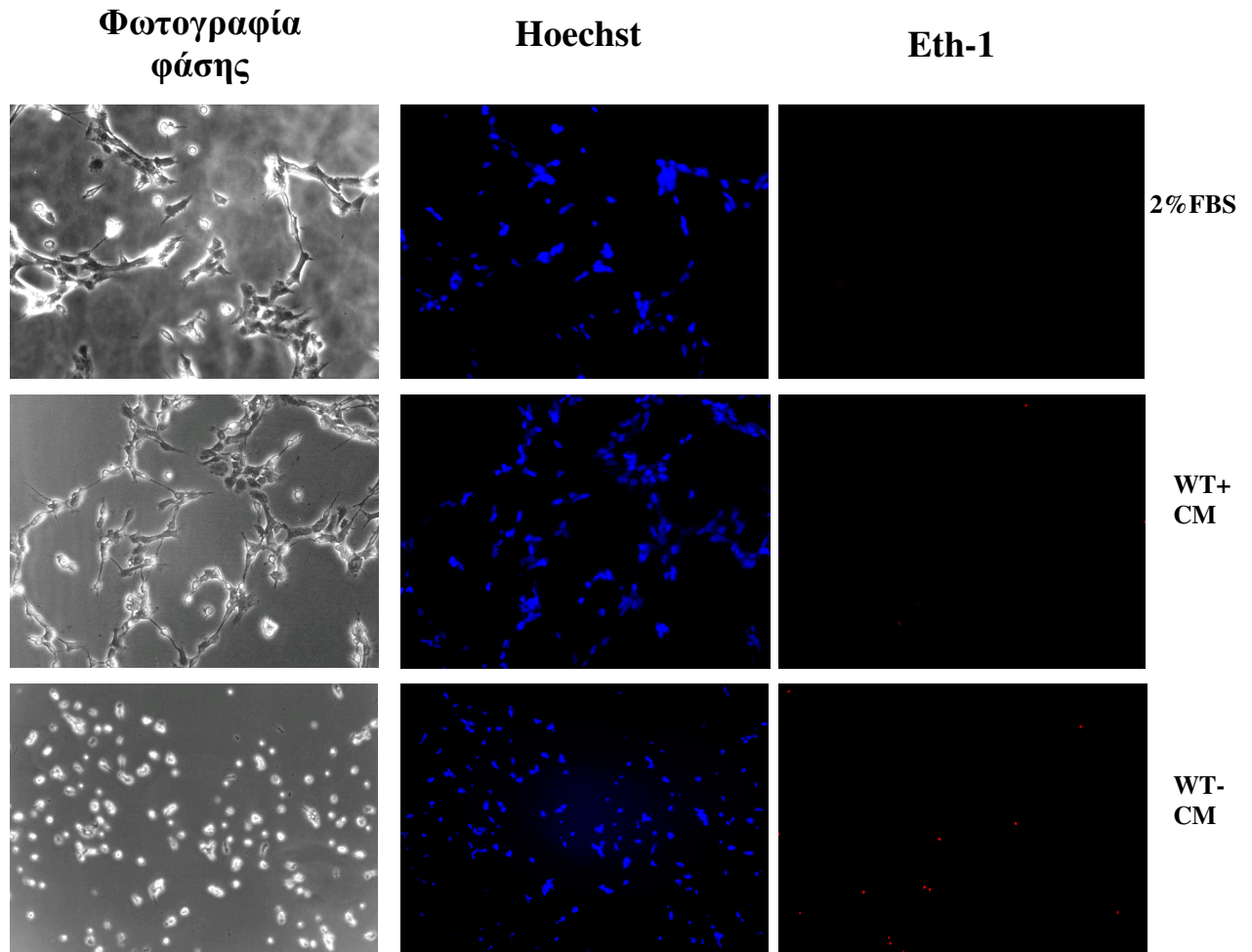
Θελήσαμε να διερευνήσουμε τις επιδράσεις της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα νευρωνικού χαρακτήρα. Για το σκοπό αυτό το θρεπτικό υλικό (CM) των WT- κυττάρων που περιέχει την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, συλλέχθηκε σε ασηπτικές συνθήκες και προστέθηκε σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων SHSY-5Y κυττάρων για 24 ώρες.

Ως ιδανικοί μάρτυρες, προστέθηκαν στα ίδια κύτταρα: απλό θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 10ml/L σε FBS, θρεπτικό υλικό από κύτταρα SHSY-5Y που εκφράζουν τη β-γαλακτοσιδάση, καθώς και θρεπτικό υλικό από WT+ κύτταρα της ίδιας σειράς που παράγουν τα βασικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης.

Παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το θρεπτικό υλικό που περιέχει εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, έχει τοξική δράση στα κύτταρα αποδέκτες. Ο κυτταρικός θάνατος προσδιορίστηκε ποσοτικά μετά από χρώση των κυττάρων με τις Hoechst και Ethidium Homodimer (Εικόνα 14).

Είναι ιδιαίτερα δύσκολο να διακρίνουμε αν ο θάνατος των κυττάρων οφείλεται σε απόπτωση ή σε νέκρωση μόνο από φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Απαιτείται ηλεκτρονική μικροσκόπηση καθώς και μια σειρά από εξειδικευμένες τεχνικές προκειμένου να καθοριστεί ο μηχανισμός του θανάτου (S. Van Cruchten και W.V an den Broeck, 2001).

Εικόνα 14. Επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης σε διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού όπου ο συνολικός αριθμός των πυρήνων έχει μπλε χρώση (Hoechst), ενώ τα νεκρά κύτταρα έχουν κόκκινη χρώση (Ethidium Homodimer). Η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη έχει τοξική δράση στα διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα. Τα SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI με 10% FBS και διαφοροποιήθηκαν με ρετινοϊκό οξύ (10 μ M) για 5 ημέρες. Μετά την 5^η μέρα έγινε προσθήκη θρεπτικού υλικού με 2% FBS, θρεπτικού υλικού από WT+ κύτταρα (CM WT+) και θρεπτικού υλικού από WT- κύτταρα (CM WT-) για 24 ώρες.



Από τις παραπάνω φωτογραφίες θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι ο μηχανισμός θανάτου των κυττάρων που επάγεται από την επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, είναι αποπτωτικός. Το Ethidium Homodimer χρωματίζει έντονα κόκκινο τον πυρήνα των αποπτωτικών κυττάρων. Η απώλεια των νευραξόνων, καθώς και οι σταδιακές αλλαγές στο σχήμα του κυτταρικού σώματος που περιλαμβάνουν τη συρρίκνωσή του ώστε τελικά το κύτταρο που πεθαίνει να αποκτήσει ένα στρογγυλό σχήμα συνηγορούν υπέρ του αποπτωτικού θανάτου.

5.3. Χρήση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G και Scyllo-inositol ως ρυθμιστών της συσσωμάτωσης της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης

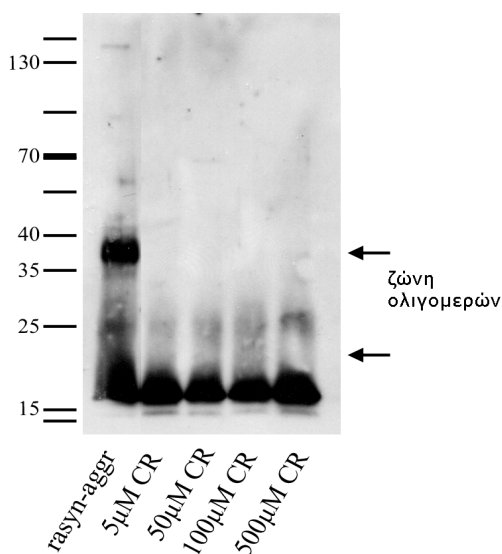
Η ικανότητα των χημικών ενώσεων Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol να αναστέλλουν το σχηματισμό ολιγομερών α-συνουκλεΐνης δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη.

Για το λόγο αυτό, ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη σε συγκέντρωση 1 mg/ml, επώαστηκε στους 37°C, υπό ανάδευση, για 24 ώρες παρουσία ή απουσία του παρεμποδιστή.

Πιο συγκεκριμένα, το Congo red προστέθηκε στο διάλυμα της πρωτεΐνης στην αρχή της επώασης. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α- συνουκλεΐνης.

Τα αποτελέσματα της επίδρασής του στις ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης παρουσιάζονται στην εικόνα 16. Από την εικόνα 16 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το Congo red μπορεί να διασπάσει τα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης, δεδομένο που είναι συμβατό με αρκετές μελέτες (Masuda et al., 2006, Klunk et al., 1998). Παρατηρούμε επίσης ότι η ικανότητα αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του Congo red στο διάλυμα.

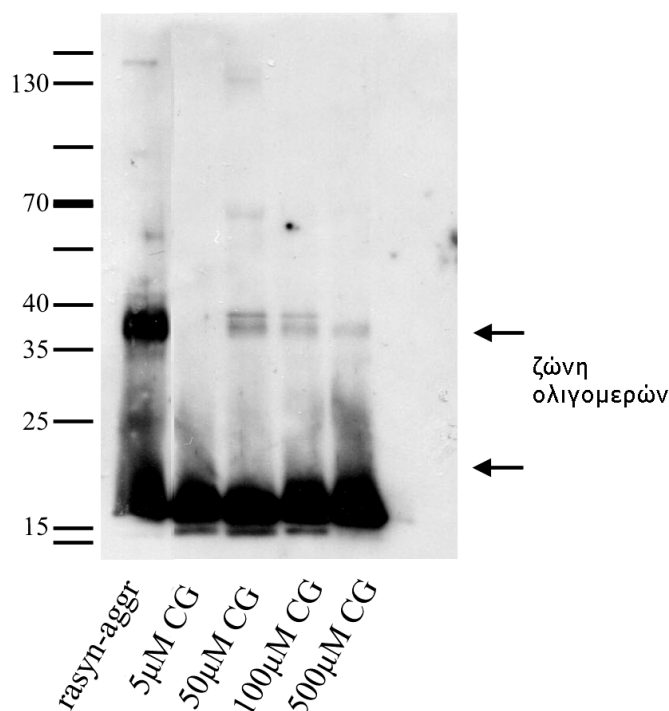
Εικόνα 16. Προσθήκη congo-red σε ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη (rasyn). Το congo-red προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 5, 50, 100 και 500μM σε διάλυμα rasyn συγκέντρωσης 1mg/ml. Η επώαση έγινε στους 37°C, υπό ανάδευση, για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η rasyn χωρίς την προσθήκη congo-red (CR). Είναι εμφανής η δημιουργία ζώνης ολιγομερών, η οποία περιορίζεται σημαντικά στα δείγματα όπου έγινε προσθήκη CR από την έναρξη της επώασης. Φαίνεται μάλιστα ότι το καλύτερο αποτέλεσμα ως προς την παρεμπόδιση δημιουργίας ολιγομερών, παρουσιάζεται με τη χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης CR.



Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαμε με τη χρήση της Chrysamine G, για την οποία επίσης έχει δειχθεί ότι διασπά τις ινιδιακές δομές της α-συνουκλεΐνης (Ishii et al., 2002). Όπως και το Congo red, έτσι και η Chrysamine G προστέθηκε στο διάλυμα της α-συνουκλεΐνης κατά την αρχή της επώασης και μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης.

Τα αποτελέσματα της δράσης της Chrysamine G απεικονίζονται στην εικόνα 17. Σε αντιστοιχία με το Congo red, η μικρότερη συγκέντρωση της Chrysamine G (1μM) είχε τη μεγαλύτερη ικανότητα να αναστέλλει το σχηματισμό συσσωματωμάτων της ανασυνδυσασμένης α-συνουκλεΐνης.

Εικόνα 17. Δράση της Chrysamine-G (CG). Η CG προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 5, 50, 100 και 500μM σε διάλυμα *rasyn* συγκέντρωσης 1mg/ml. Η επώαση έγινε στους 37°C, υπό ανάδευση, για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η *rasyn* χωρίς την προσθήκη CG. Είναι εμφανής η δημιουργία ζώνης ολιγομερών, η οποία περιορίζεται σημαντικά στα δείγματα όπου έγινε προσθήκη CG από την έναρξη της επώασης. Φαίνεται μάλιστα ότι το καλύτερο αποτέλεσμα ως προς την παρεμπόδιση δημιουργίας ολιγομερών, παρουσιάζεται με τη χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης CG.



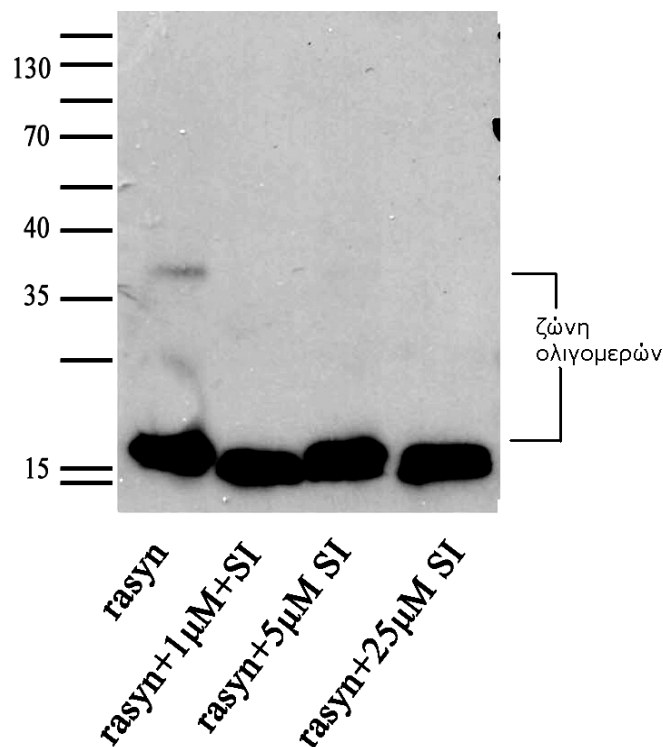
Τέλος, χρησιμοποιήσαμε και τη χημική ουσία *scyllo*-inositol, η οποία έχει ήδη δοκιμαστεί με πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα στην παρεμπόδιση της δημιουργίας ολιγομερών του αμυλοειδούς β (Fenili et al., 2007). Όπως και οι δυο προηγούμενες ουσίες διάλυμα ανασυνδυσασμένης α-συνουκλεΐνης, συγκέντρωσης 1

mg/ml, επώαστηκε στους 37°C, υπό ανάδευση, για 4 ημέρες, παρουσία ή απουσία του παρεμποδιστή.

Οι συγκεντρώσεις της *scyllo*-inositol που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1, 5 και 25μΜ. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης.

Τα αποτελέσματα της δράσης της *scyllo*-inositol απεικονίζονται στην εικόνα 18. Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε ότι η ελάχιστη συγκέντρωση *scyllo*-inositol (1μΜ) που χρησιμοποιήσαμε, έχει το ίδιο αποτέλεσμα στην αναστολή του σχηματισμού συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Εικόνα 18. Δράση της *scyllo*-inositol (SI). Η SI προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 25μΜ σε διάλυμα *rasyn* συγκέντρωσης 1mg/ml. Η επώαση έγινε στους 37°C, υπό ανάδευση, για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η *rasyn* χωρίς την προσθήκη SI. Φαίνεται η εξαφάνιση της ζώνης των ολιγομερών ακόμα και με τη χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης 1μΜ SI.

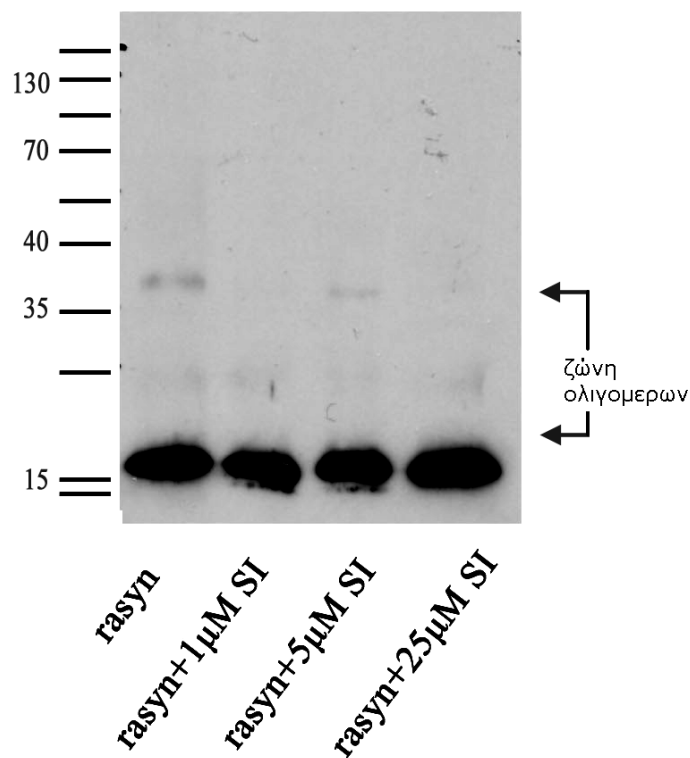


Στην περίπτωση της *scyllo*-inositol δοκιμάσαμε και τη δυνατότητά της να διασπάσει ήδη σχηματισμένα ολιγομερή, μια άποψη που υποστηρίζεται από την McLaurin και συνεργάτες (McLaurin et al., 2006). Προσθέσαμε, λοιπόν τις ίδιες συγκεντρώσεις *scyllo*-inositol 1, 5 και 25μΜ, σε διάλυμα 1mg/ml της α-συνουκλεΐνης, αφού αυτό είχε προηγουμένως υποστεί τη διαδικασία της

ανακίνησης για 3 ημέρες, στους 37°C. Το διάλυμα κατόπιν επώαστηκε για 24 ακόμα ώρες και μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης. Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε ότι η μικρότερη συγκέντρωση scyllo-inositol 1 μ M που χρησιμοποιήσαμε είχε τα καλύτερα αποτελέσματα στη διάσπαση των ήδη σχηματισθέντων ολιγομερών της α -συνουκλεΐνης

Τα αποτελέσματα από το συγκεκριμένο πείραμα απεικονίζονται στην εικόνα 19.

Εικόνα 19. Δράση της scyllo-inositol (SI). Η SI προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 25 μ M σε διάλυμα rasyn συγκέντρωσης 1mg/ml που είχε ήδη επωαστεί στους 37°C, υπό ανάδευση, για 3ημέρες. Στη συνέχεια το διάλυμα επώαστηκε για 24 ακόμα ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, 100ng από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η rasyn χωρίς την προσθήκη SI. Φαίνεται η εξαφάνιση της ζώνης των ολιγομερών ακόμα και με τη χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης 1 μ M SI.



5.4. Επίδραση των χημικών ουσιών Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol σε διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα

Στο επόμενο στάδιο των πειραμάτων μας εφαρμόσαμε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM) σε κυτταρικές σειρές. Ήδη είχαμε ελέγξει, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2., την κυτταροτοξική δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης. Στη συνέχεια, παρατηρήσαμε τυχόν προστατευτική δράση μετά την προσθήκη των τριών χημικών ρυθμιστών της συσσωμάτωσης της α-συνουκλείνης (Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol) στο CM.

Επειδή τα κύτταρα είναι ένας ζωντανός οργανισμός, είναι επόμενο να υπεισέρχεται μια σειρά από αστάθμητους παράγοντες που δεν υπάρχουν στα πειράματα με την ανασυνδυασμένη α-συνουκλείνη. Για το λόγο αυτό, στα πειράματα με τις κυτταρικές καλλιέργειες, οι αρχικές δόσεις των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι χαμηλότερες αποτελεσματικές δόσεις, ως προς την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματώσεων, που είχαν προκύψει από τα πειράματα με την ανασυνδυασμένη α-συνουκλείνη. Συγκεκριμένα, οι δόσεις αυτές ήταν 1μM και 5μM και για τους τρεις χημικούς αναστολείς (Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol).

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: αρχικά έγινε συλλογή θρεπτικού μέσου (conditioned medium) από SHSY-5Y κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση (β-gal). Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζουμε το γεγονός ότι οποιαδήποτε τοξικότητα καταγραφεί στο πείραμά μας θα οφείλεται μόνο στην τοξική δράση των αναστολέων της συσσωμάτωσης, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί η β-γαλακτοσιδάση είναι μια πρωτεΐνη που δεν εκκρίνεται φυσιολογικά και δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα.

Στη συνέχεια, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκαν οι χημικοί αναστολείς και έγινε επώαση για 24 ώρες στους 4°C με συνεχή ανακίνηση. Ακολούθησε εφαρμογή του επεξεργασμένου αυτού θρεπτικού υλικού σε διαφοροποιημένα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY-5Y. Μετά την πάροδο 24 ωρών έγινε παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για κάθε συνθήκη.

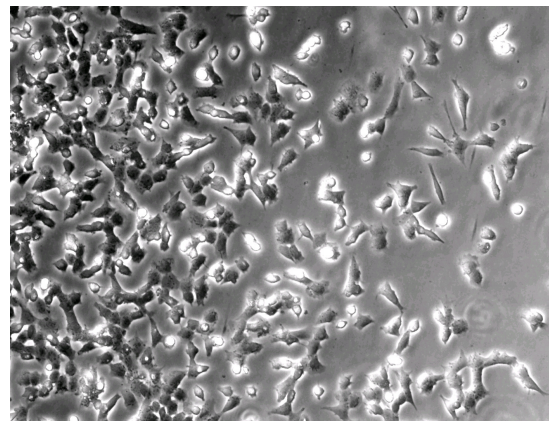
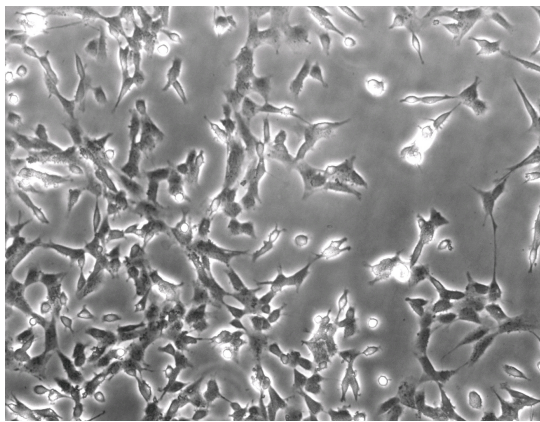
Το συμπέρασμα που εξάγαμε από αυτή την πειραματική διαδικασία ήταν ότι οι δύο (Congo red, scyllo-inositol) από τους τρεις χημικούς αναστολείς που χρησιμοποιήσαμε ήταν τοξικοί για τα κύτταρα σε συγκέντρωση 5μM και επομένως έπρεπε να μειωθεί η δόση τους σε πειράματα με κυτταρικές καλλιέργειες. Μετά από μια σειρά δοκιμών, καθορίσαμε τελικά τις δόσεις που θα εφαρμόζαμε στα επόμενα πειράματά μας με κύτταρα σε 0,4μM και για τις τρεις ουσίες, Congo red, scyllo-

inositol και Chrysamine G ενώ ο χρόνος επώασης περιορίστηκε στις 4 ώρες (Εικόνα 21).

Εικόνα 21. Επίδραση των αναστολέων Congo-Red (CR), Chrysamine-G (CG) και Scyllo-inositol (SI) σε κύτταρα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο. Τα SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI με 10% FBS και διαφοροποιήθηκαν με ρετινοϊκό οξύ (10 μM) για 5 ημέρες. Μετά την 5^η μέρα έγινε προσθήκη θρεπτικού υλικού με 2% FBS, θρεπτικού υλικού από κύτταρα β -gal και θρεπτικού υλικού από κύτταρα β -gal στο οποίο είχε προστεθεί CR, CG και SI σε συγκέντρωση 1 μM και 5 μM . Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Οι αναστολές CR, CG εμφανίστηκαν τοξικοί για τα κύτταρα σε συγκέντρωση 5 μM .

2% FBS

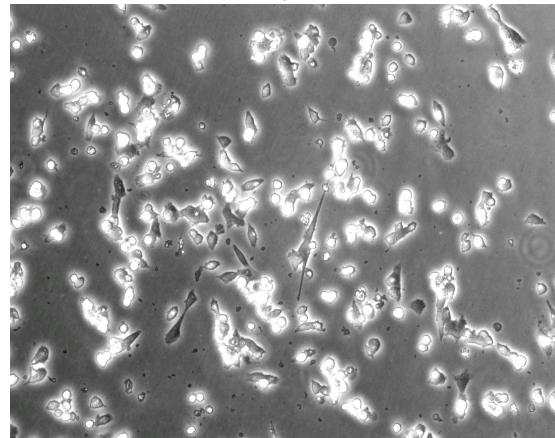
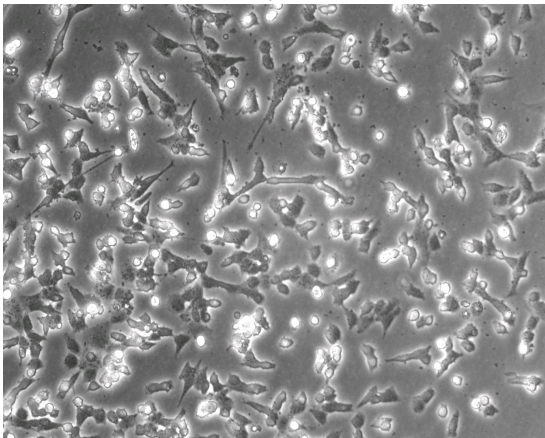
β -gal



CR

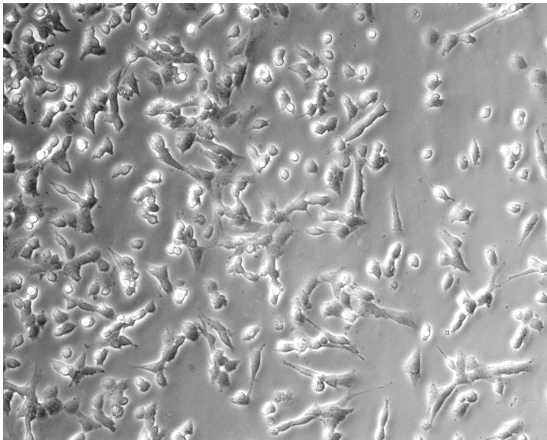
1 μM

5 μM

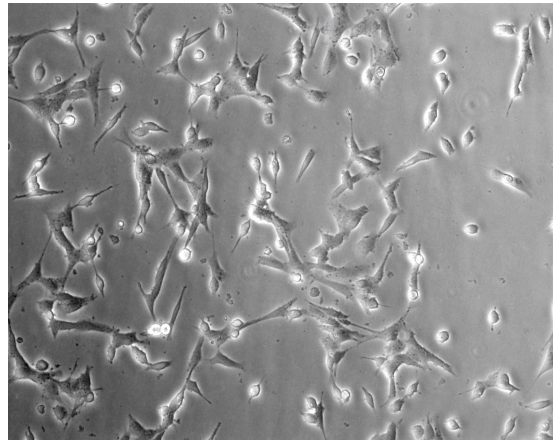


CG

1 μ M

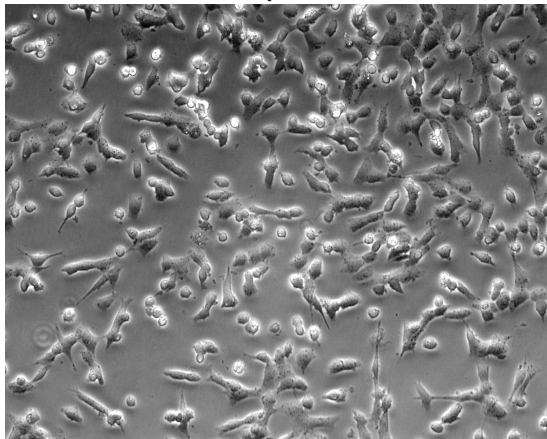


5 μ M

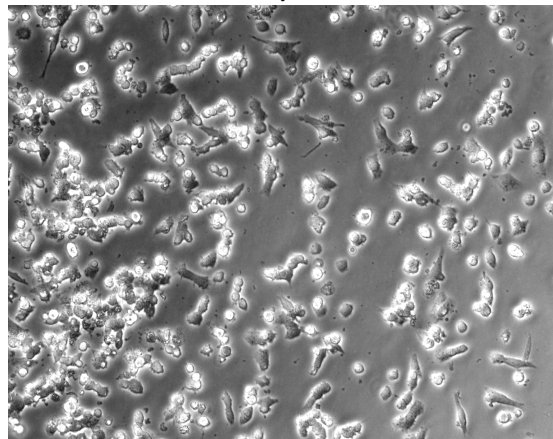


SI

1 μ M

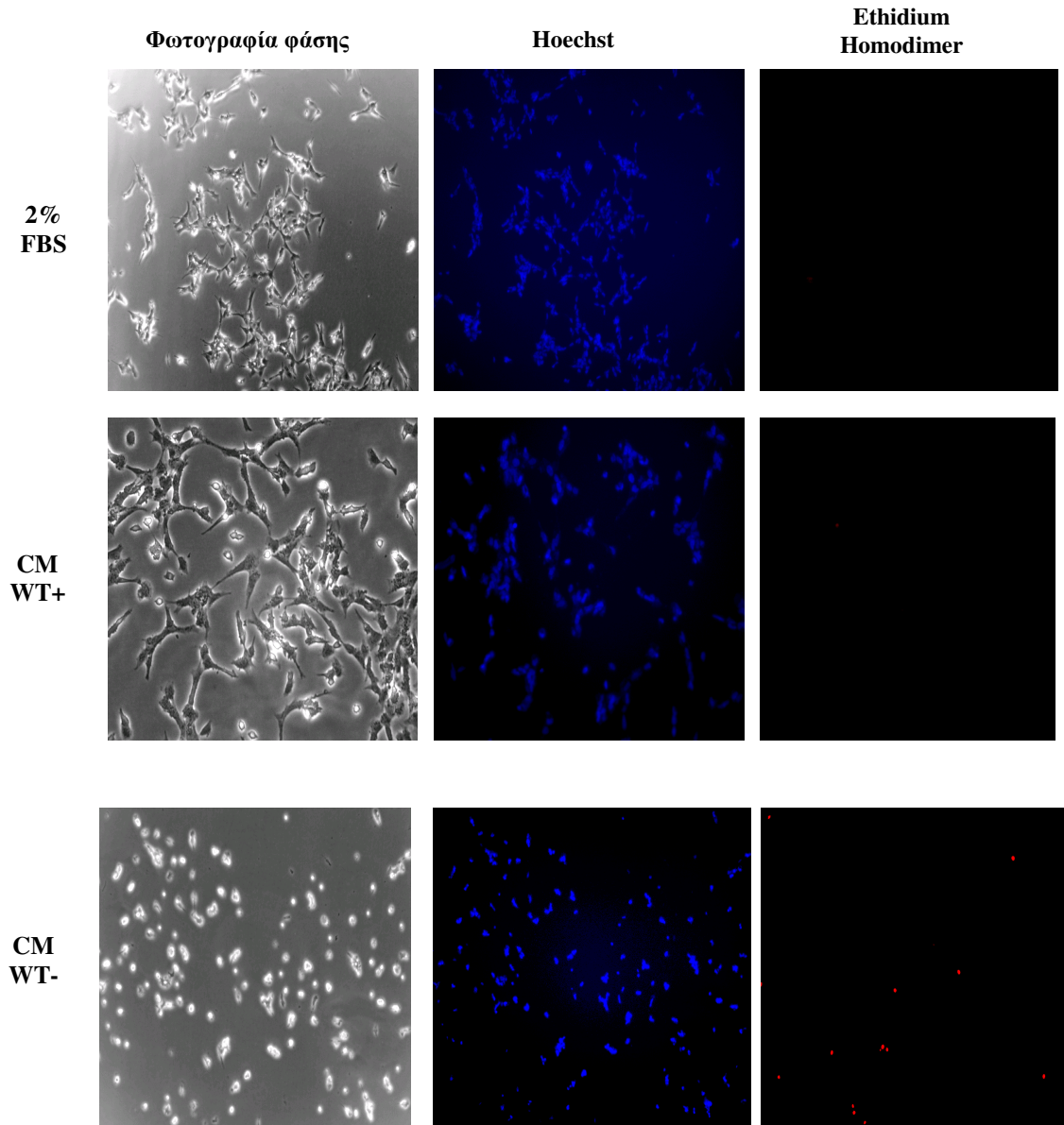


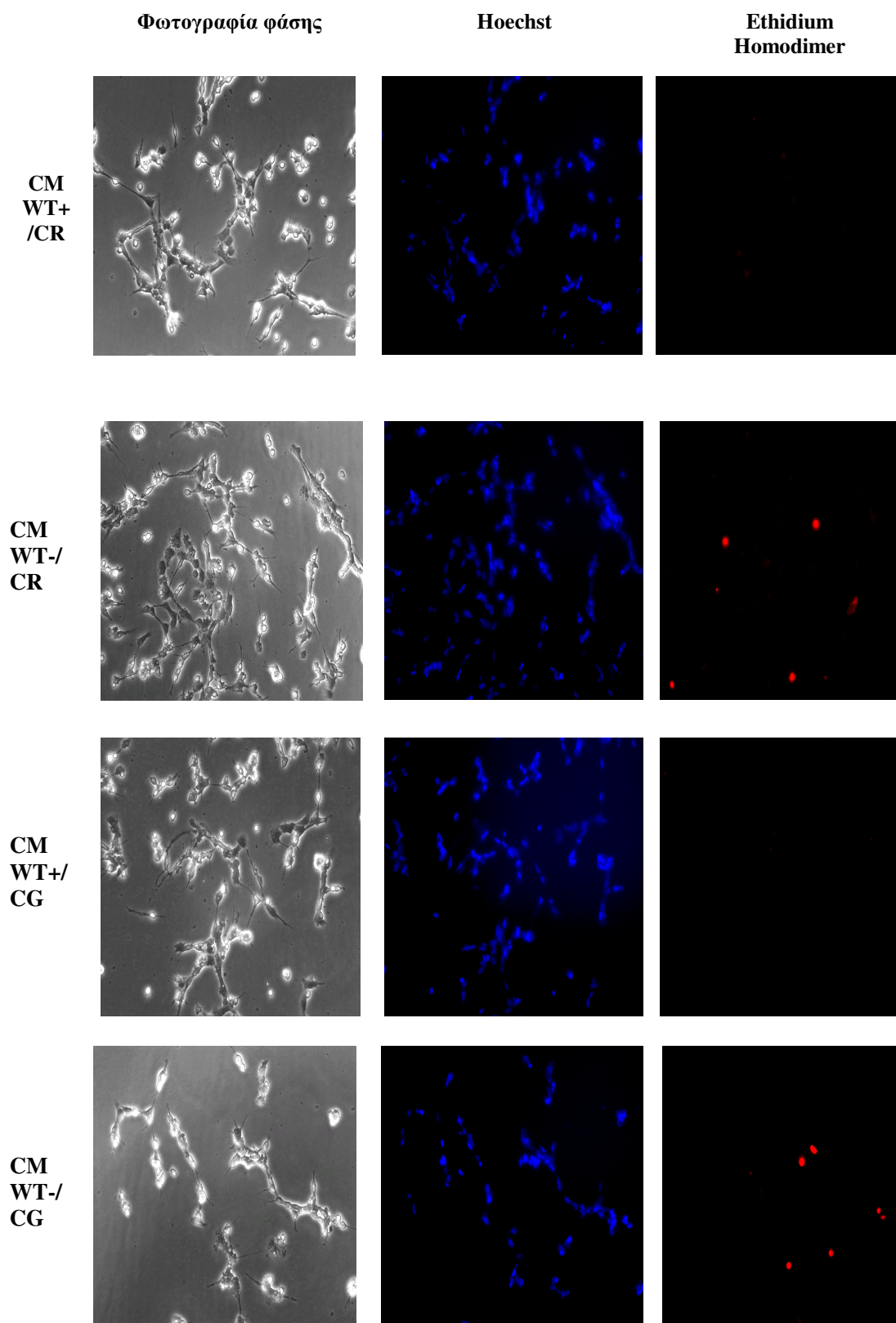
5 μ M

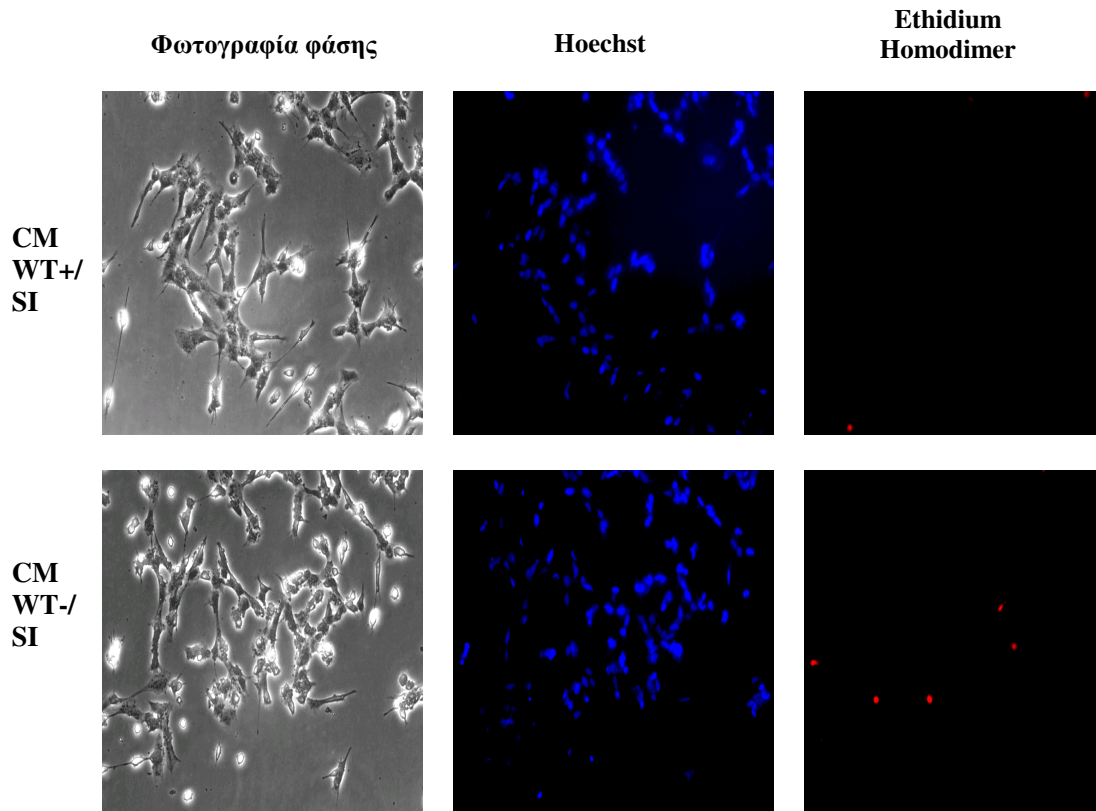


Στη συνέχεια επαναλάβαμε τα πειράματα εφαρμόζοντας την ίδια διαδικασία με CM από WT-dox και WT+dox SHSY-5Y κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή, έγινε και χρώση των κυττάρων με τις χρωστικές Hoechst και Ethidium Homodimer, παρατήρηση και φωτογράφησή τους. (Εικόνα 22)

Εικόνα 22. Προστατευτική δράση των ουσιών Congo-Red (CR), Chrysamine-G (CG) και Scyllo-inositol (SI) σε κύτταρα που επώαστηκαν με CM. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού όπου ο συνολικός αριθμός των πυρήνων έχει μπλε χρώση (Hoechst), ενώ τα νεκρά κύτταρα έχουν κόκκινη χρώση (Ethidium Homodimer). Η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη έχει τοξική δράση στα διαφοροποιημένα SHSY-5Y κύτταρα. Τα SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI με 10% FBS και διαφοροποιήθηκαν με ρετινοϊκό οξύ (10 μ M) για 5 ημέρες. Μετά την 5^η μέρα, έγινε προσθήκη για 4 ώρες, θρεπτικού υλικού με 2% FBS, θρεπτικού υλικού από WT+ κύτταρα (CM WT+), θρεπτικού υλικού από WT- κύτταρα (CM WT-), θρεπτικού υλικού στο οποίο είχε προστεθεί CR, CG και SI σε συγκέντρωση 0,4 μ M.



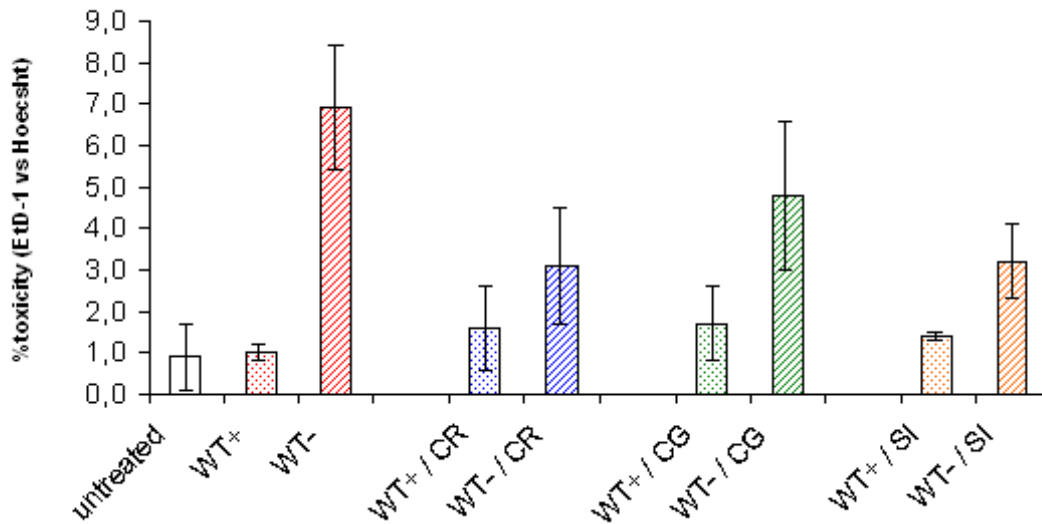




Τα στοιχεία των μετρήσεων αυτών επεξεργάστηκαν στατιστικά και τα αποτελέσματα αποδίδονται στη γραφική παράσταση (Εικόνα 23). Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζεται το ποσοστό της κυτταροτοξικότητας (ως λόγος των νεκρών κυττάρων, που φθορίζουν μετά τη χρώση τους με Ethidium Homodimer, προς τον αριθμό του συνόλου των κυττάρων, των οποίων οι πυρήνες φθορίζουν μετά τη χρώση τους με Hoechst), ενώ στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Το συμπέρασμα που εξάγεται από το παραπάνω πείραμα, όπως αυτό απεικονίζεται και στο σχετικό διάγραμμα, είναι ότι η προσθήκη των χημικών ρυθμιστών της συσσωμάτωσης στο θρεπτικό υλικό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από την υπερέκφραση της ασυνουκλείνης. Όπως καταγράφεται και στο διάγραμμα, ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη CM από WT- κύτταρα, χωρίς να περιέχεται κάποιος από τους τρεις αναστολείς, ήταν περίπου επταπλάσιος από την περίπτωση κατά την οποία προστέθηκε θρεπτικό υλικό με 2% FBS, καθώς και CM από WT+ κύτταρα. Ωστόσο, στην περίπτωση που στο CM από WT- κύτταρα έχει προστεθεί κάθε φορά και ένας εκ των τριών χημικών ρυθμιστών της συσσωμάτωσης (Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol), η παραπάνω αναλογία μειώθηκε και σε σχέση με την αντίστοιχη εφαρμογή CM από WT+ κύτταρα, κυμάνθηκε περίπου στο διπλάσιο. Το πείραμα επαναλήφθηκε με παρόμοια αποτελέσματα.

Εικόνα 23. Ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας. Γραφική παράσταση όπου απεικονίζεται το ποσοστό της κυτταροτοξικότητας σε κάθε μια από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. SHSY-5Y κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI με 10% FBS και διαφοροποιήθηκαν με ρετινοϊκό οξύ (10 μ M) για 5 ημέρες. Μετά την 5^η μέρα, έγινε προσθήκη για 4 ώρες, θρεπτικού υλικού με 2% FBS (untreated), CM από WT+ κύτταρα (WT+), CM από WT- κύτταρα (WT-), CM από WT+ κύτταρα και WT- κύτταρα στο οποίο είχε προστεθεί CR, CG και SI σε συγκέντρωση 0,4 μ M. CR: Congo Red, CG: Chrysamine G, SI: Scyllo-Inositol.



5.5. In vitro κατεργασία του θρεπτικού υλικού που περιέχει την εκκρινόμενη α -συνουκλειΐνη (CM) με τις χημικές ενώσεις Congo red, Chrysamine G και scyllo-inositol

Αρχικά, επιχειρήσαμε να ελέγξουμε αν πράγματι οι τρεις ουσίες που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας (Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol), παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλειΐνης.

Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε τις ουσίες αυτές σε θρεπτικό υλικό που περιέχει την εκκρινόμενη α -συνουκλειΐνη. Τα WT+ και WT- κύτταρα καλλιεργήθηκαν για τουλάχιστον 8 ημέρες παρουσία και απουσία δοξουκυκλίνης, αντίστοιχα. Μετά από καλλιέργεια για 2 ημέρες, το θρεπτικό υλικό (CM) συλλέχθηκε και επωάστηκε με τους χημικούς ρυθμιστές με ανάδευση, για 24 ώρες στους 4°C. Οι δόσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν 0,5 μ M για τα Congo red και scyllo-inositol, και 1 μ M για την Chrysamine G. Μετά την πάροδο του εικοσιτετραώρου, έγινε συμπύκνωση του υλικού με τη μέθοδο της υπερδιήθησης, ώστε το τελικό θρεπτικό μέσο να είναι 35 φορές πυκνότερο από το αρχικό. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωση κατά western στα δείγματα που προέκυψαν από την ανωτέρω διαδικασία.

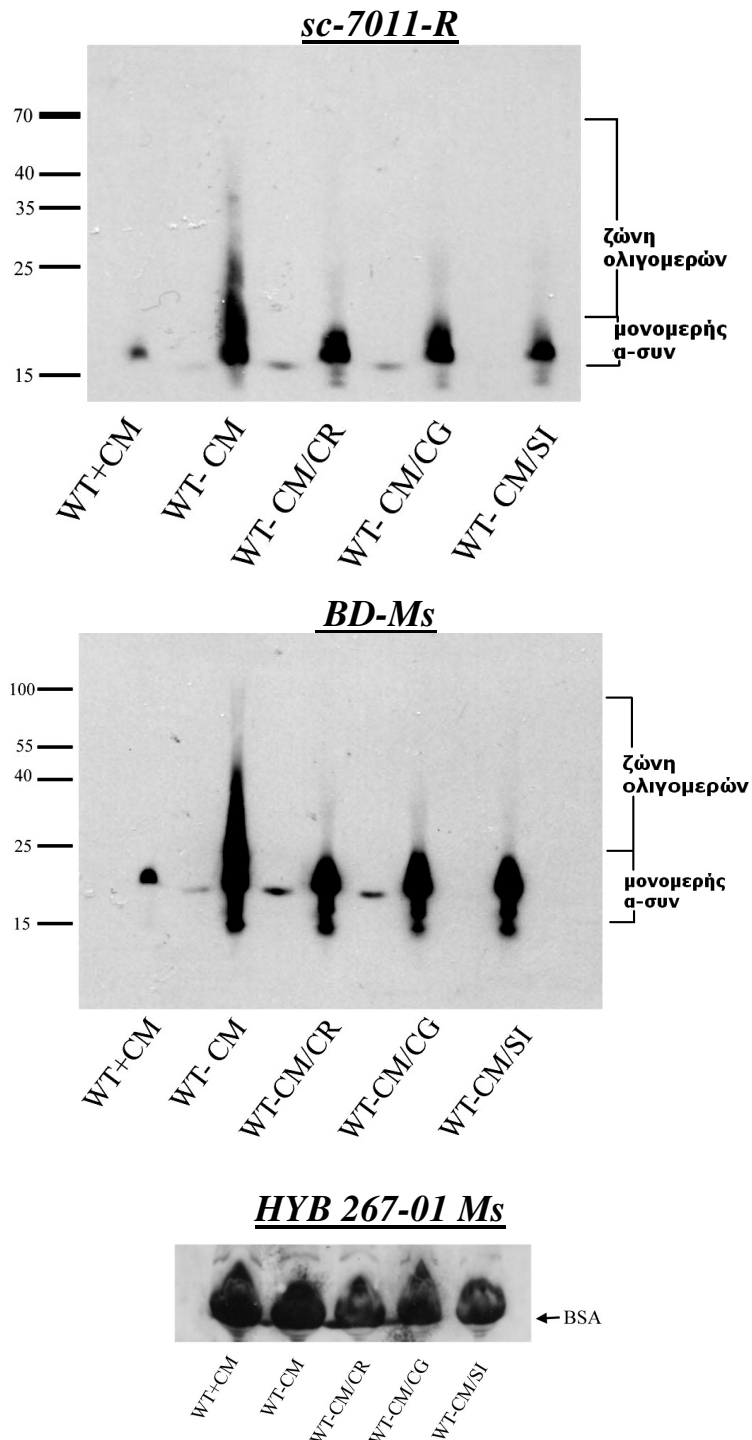
Τα αποτελέσματα της δράσης των χημικών ρυθμιστών της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης είναι εμφανή (Εικόνα 20). Στη στήλη WT-CM, διακρίνονται καθαρά τόσο η μονομερής μορφή, όσο και τα ολιγομερή της πρωτεΐνης. Στις τρεις επόμενες στήλες, όπου έχουμε την προσθήκη των αναστολέων στο WT-CM, είναι ιδιαίτερα εμφανής η εξαφάνιση των ολιγομερών αυξημένου μοριακού βάρους, ενώ το ποσό της μονομερούς πρωτεΐνης, παρουσιάζεται ελαφρά αυξημένο, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ολιγομερή διασπώνται και κατακρημνίζονται ως μονομερές της α-συνουκλεΐνης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε για δυο διαφορετικές ομάδες θρεπτικού υλικού, που συλλέχθηκαν από δυο ανεξάρτητα μεταξύ τους ζεύγη κυττάρων WT+ και WT-. Και στις δυο περιπτώσεις, το αποτέλεσμα της ανοσοαντίδρασης κατά western ήταν το ίδιο.

Χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικά αντισώματα για τη σήμανση της α-συνουκλεΐνης σε κάθε μεμβράνη, το πολυκλωνικό sc-7011, που προέρχεται από κόνικλο και το μονοκλωνικό BD, που προέρχεται από επίμου, προκειμένου να ελέγξουμε την επαναληψιμότητα και επομένως την εγκυρότητα της μεθόδου.

Η διαφορά των δυο αντισωμάτων ως προς τη σήμανση, έγκειται στο ότι με το BD απεικονίζονται καλύτερα τα ολιγομερή, ενώ με το sc-7011 απεικονίζεται καλύτερα το μονομερές της α-συνουκλεΐνης. Τέλος, έγινε σήμανση των μεμβρανών με το μονοκλωνικό αντίσωμα HYB 267-01, έναντι της πρωτεΐνης BSA του ορού, για τον έλεγχο της ορθής «φόρτωσης» των δειγμάτων στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης.

Εικόνα 20. *In vitro* κατεργασία του CM με τις χημικές ενώσεις congo-red (CR), chrysamine-G (CG) και scyllo-inositol (SI). Το CM συλλέχθηκε και επωάστηκε με τους χημικούς ρυθμιστές με ανάδευση, για 24 ώρες στους 4°C. Οι δόσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν 0,5μM για τα congo-red και scyllo-inositol, και 1μM για την chrysamine-G. Μετά την πάροδο του εικοσιτετραώρου, έγινε συμπύκνωση του υλικού με τη μέθοδο της υπερδιήθησης. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωση κατά western. Η ίδια μεμβράνη έχει σημειωθεί με το αντίσωμα sc-7011-Rabbit (αριστερά), με το BD-monoclonal-Mouse (δεξιά), για έλεγχο της επαναληψιμότητας του αποτελέσματος, και με το αντίσωμα HYB 267-01 Mouse κατά της πρωτεΐνης BSA (κάτω) για τον έλεγχο της ορθής «φόρτωσης» των δειγμάτων στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης.



6. Συζήτηση

Η α-συνουκλείνη είναι μια νευρωνική πρωτεΐνη που έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό νευροεκφυλιστικών νόσων που καλούνται με τον γενικό όρο συνουκλείνοπάθειες και σε αυτές συμπεριλαμβάνεται μεταξύ άλλων και η νόσος Πάρκινσον. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των νόσων είναι η παρουσία πρωτεϊνικών εγκλείστων που καλούνται σωμάτια Lewy και περιλαμβάνουν ως βασική πρωτεΐνη την α-συνουκλείνη. Φυσιολογικά, η α-συνουκλείνη υπάρχει στα κύτταρα τόσο σε διαλυτή μορφή όσο και σε μορφή α-έλικας που παρουσιάζει συγγένεια πρόσδεσης με τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Παρουσιάζει την τάση να πολυμερίζεται, σχηματίζοντας πρώτα διαλυτά, και σταδιακά μη διαλυτά ολιγομερή, δημιουργώντας συσσωματώματα, και τελικά ινιδιακές δομές που προσομοιάζουν με το β-αμυλοειδές.

Η ακριβής φυσιολογική της λειτουργία στα κύτταρα δεν είναι γνωστή. Πιθανολογείται ότι εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα μέσω αλληλεπίδρασης με εγκεφαλικά κυστίδια και φωσφολιπιδικές μεμβράνες, έχει ρόλο μοριακής σαπερόνης, δρα ως αναστολέας της υδροξυλάσης της τυροσίνης, μειώνοντας τη σύνθεση ντοπαμίνης, εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διατήρηση των συνάψεων, στη νευρωνική διαφοροποίηση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, σε φλεγμονώδεις διαδικασίες και τέλος στο επίπεδο του κυτταροσκελετού με τροποποίηση της λειτουργίας στους μικροσωληνίσκους. Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές, ότι οποιαδήποτε διαταραχή τόσο στα επίπεδα όσο και στη φυσιολογική δομή της α-συνουκλείνης θα επηρεάσει τη λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων και κατ'επέκταση του οργανισμού.

Η πεποίθηση ότι η α-συνουκλείνη είναι μια πρωτεΐνη με αποκλειστικά ενδοκυττάρια εντόπιση έχει πλέον καταρριφθεί, αφού από πρόσφατες μελέτες προέκυψαν στοιχεία για την ύπαρξη μιας εξωκυττάριας μορφής που απελευθερώνεται από τους νευρώνες και εντοπίζεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλάσμα, καθώς και σε θρεπτικό μέσο από καλλιέργειες με ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος (Borghì et al., 2000, El-Agnaf et al., 2003, Miller et al., 2004).

In vitro, η έκκριση της α-συνουκλείνης είχε διερευνηθεί με μελέτες επιμόλυνσης σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY-5Y (Lee et al., 2005) καθώς και SK-N-BE (Sung et al., 2005) και με τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος M17 που υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου α-συνουκλείνη, επίσης μετά από επιμόλυνση με το cDNA της (El-Agnaf et al., 2003).

Στα δικά μας πειράματα ενισχύουμε την άποψη ότι η α-συνουκλείνη εκκρίνεται από τα κύτταρα φυσιολογικά (δηλαδή χωρίς ιδιαίτερη διέγερση) στο

θρεπτικό μέσο των SHSY-5Y κυττάρων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη. Η έκκριση αυτή αφορά όχι μόνο τη μονομερή μορφή αλλά και τις ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης. Ωστόσο, ο μηχανισμός έκκρισης παραμένει άγνωστος.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα στην παρούσα μελέτη είναι ότι όλα μας τα αποτελέσματα αφορούν φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη από μια κυτταρική σειρά που προέρχεται από έναν αρχικό κλώνο, στον οποίο η έκκριση επάγεται μέσω ενός TET-off συστήματος. Δεν αφορούν δηλαδή, ανασυνδυασμένη μορφή της πρωτεΐνης. Επομένως, το δικό μας σύστημα μελέτης παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη ομοιότητα με το τι πραγματικά συμβαίνει στη φύση, στον ανθρώπινο δηλαδή οργανισμό, τόσο ως προς την έκκριση όσο και ως προς την δημιουργία ολιγομερών α-συνουκλεΐνης.

Η εκκρινόμενη αυτή πρωτεΐνη, ασκεί κυτταροτοξική δράση, ο μηχανισμός της οποίας παραμένει επίσης άγνωστος αν και έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα, όπως επαγωγή μηχανισμών στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Smith W.W. et al., 2005), πρόβλημα στη μεταφορά κυστιδίων και πρωτεϊνών (McNaught K.S. et al., 2001), πρόβλημα στο σύστημα αποδόμησης πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα στο σύστημα ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος (Stefanis L. et al., 2001), σχηματισμός πόρων στην κυτταρική μεμβράνη (Volles and Lansbury 2003), επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω διέγερσης νευρογλοιακών κυττάρων (Zhang et al., 2005, Seo et al., 2002, El-Agnaf et al., 1998).

Στα δικά μας πειράματα, επιβεβαιώσαμε την τοξικότητα της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, εφαρμόζοντας το θρεπτικό υλικό που περιέχει εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM) από SHSY-5Y κύτταρα, σε κυτταρικές καλλιέργειες διαφοροποιημένων ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος (SHSY-5Y) και μετρώντας τον κυτταρικό θάνατο.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι επώαση της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης υπό ορισμένες συνθήκες οδηγεί σταδιακά στην δημιουργία μη διαλυτών ινιδίων και συσσωματώσεων (Conway et al., 1998). Σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης έχουν αναγνωρισθεί σε νευρώνες σε μορφές άλλες εκτός των σωματίων Lewy (Irizarry et al., 1998, Galvin et al., 1999, Arima et al., 1998a, Braak et al., 1999, Crowther et al., 2000). Πλέον αποτελεί γενική πεποίθηση ότι τα πρωτοϊνίδια και όχι οι πιο ώριμες συσσωματωμένες μορφές αποτελούν την τοξική μορφή της α-συνουκλεΐνης (Goldberg and Lansbury 2000).

Χρησιμοποιώντας ορισμένες χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Congo red, Chrysamine G, scyllo-inositol), επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε τυχόν προστατευτική τους δράση που να οφείλεται στην ιδιότητά τους να αποτρέπουν το σχηματισμό ολιγομερών α-συνουκλεΐνης, αφού προηγουμένως διασφαλίσαμε ότι οι δόσεις που εφαρμόσαμε

δεν είναι οι ίδιες τοξικές για τα κύτταρα. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Emmanouilidou E. et al., 2008), είχεδειχθεί ότι η προσθήκη Congo red επανακαθιστά τη λειτουργία του πρωτεασώματος, απομακρύνοντας τα ολιγομερή α-συνουκλεΐνης που την παρεμποδίζουν.

Πράγματι τα αποτελέσματα που λάβαμε και για τις τρεις ουσίες συνηγορούν υπέρ μιας νευροπροστατευτικής δράσης των ουσιών αυτών. Μελλοντικά λοιπόν, οι συγκεκριμένες ουσίες ή ανάλογά τους θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητική φαρμακευτική αγωγή για ασθενείς που πάσχουν από νόσο Πάρκινσον ή άλλες μορφές συνουκλεΐνοπαθειών. Στο σημείο αυτό ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα πειράματα που έχουν γίνει μέχρι στιγμής είναι στην πλειονότητά τους *in vitro*. Σε ένα ζώντα οργανισμό υπεισέρχονται πολλαπλοί περιοριστικοί παράγοντες σχετικά με τη χρήση τέτοιων χημικών ουσιών.

Συγκεκριμένα, σχετικά με το Congo red, η διαπερατότητά του διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι περιορισμένη. Είναι δυνητικά τοξικό, ενώ έχει ενοχοποιηθεί και για καρκινογένεσεις (κυρίως ηπατοκυτταρικό και καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης). Τέλος, έχει καταδειχθεί με πειραματικές μεθόδους ότι διαθέτει και τερατογόνους ιδιότητες. Οι περιορισμοί αυτοί είναι ιδιαίτερα αποτρεπτικοί για πιθανή χρήση του ως φαρμακευτική αγωγή. Η έρευνα στον τομέα αυτό θα μπορούσε να στραφεί προς χημικά ανάλογα του Congo red, που θα διαθέτουν τη δραστηριότητά του ως προς τη διάσπαση των ολιγομερών, αλλά ταυτόχρονα θα στερούνται της τοξικότητάς του. Πολύ σημαντικό επίσης, είναι να ξεπεραστεί το εμπόδιο της περιορισμένης διαπερατότητας στον εγκέφαλο. Η Chrysamine G είναι το πλέον μελετημένο χημικό ανάλογο του Congo red. Έχει μικρότερο μέγεθος και είναι περισσότερο λιπόφιλο μόριο, ιδιότητες που της επιτρέπουν τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επιπλέον, είναι λιγότερο τοξική. Ωστόσο η χρήση της σε ζωντανούς οργανισμούς παραμένει υπό διερεύνηση.

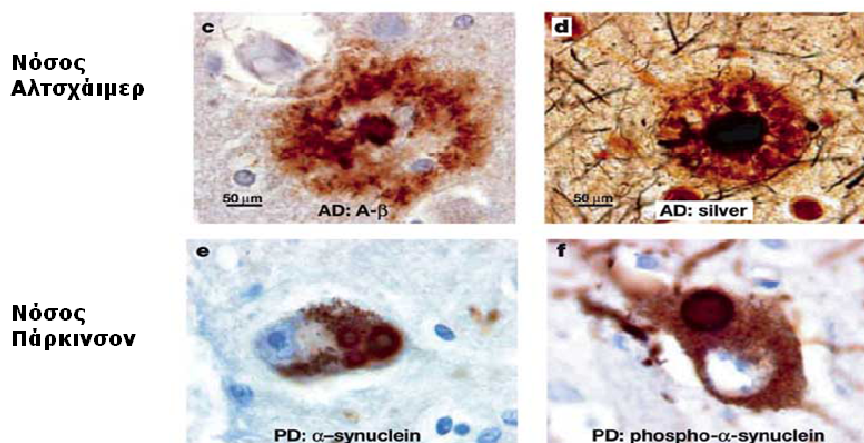
Στον αντίποδα των παραπάνω βρίσκεται η χρήση της ουσίας *scyllo*-inositol, η οποία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πιθανή αγωγή στη νόσο Αλτσχάιμερ. Η δράση της *scyllo*-inositol (*scyllo*-cyclohexanehexol) έχει μελετηθεί εκτενώς *in vitro* και *in vivo*. *In vitro*, βρέθηκε ότι προκαλεί άμεση αλλαγή στη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου Αβ42, του πιο νευροτοξικού συστατικού των αμυλοειδικών πλακών στη νόσο Αλτσχάιμερ, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση μικρών β ολιγομερών και τη διακοπή της δημιουργίας ινιδιακών δομών (McLaurin et al., 2000). *In vivo*, όταν χορηγήθηκε *peros* σε ποντίκια TgCRND8 (που υπερεκφράζουν τις μεταλλάξεις της APP που ανήκουν στο σουηδικό και στον ινδιάνικο τύπο της νόσου Αλτσχάιμερ), εμπόδισε το σχηματισμό Αβ συσσωματωμάτων, βελτίωσε σημαντικά τη χωρική μνήμη, ελάττωσε τα παθολογικά ευρήματα της νόσου στον εγκέφαλο και μείωσε τη θνητότητα (McLaurin et al., 2006). Εξαιρετικά σημαντικό είναι το

γεγονός ότι τα θεραπευτικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν άσχετα από τη χρονική στιγμή χορήγησης της *scyllo*-inositol σε σχέση με την έναρξη της εμφάνισης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της νόσου (McLaurin et al., 2006). Αυτό συνεπάγεται ότι η ουσία όχι μόνο παρεμποδίζει το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών, αλλά διαλύει και τα ήδη σχηματισμένα β ινίδια.

Επιπλέον σε μια άλλη μελέτη (Townsend et al., 2006), οι ερευνητές απέδειξαν ότι η *peros* χορήγηση *scyllo*-inositol ανέστρεψε τα γνωστικά ελλείμματα που προκλήθηκαν σε αρουραίους από την ICV έγχυση αμυλοειδούς β. Παράλληλα, κατέγραψαν με ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους τα δυναμικά πεδίου σε ιστοτεμάχια της περιοχής CA1 του ιππόκαμπου ποντικών που είχαν προηγουμένως επωαστεί με CM πλούσιο σε αμυλοειδές β στο οποίο είχε προστεθεί *scyllo*-inositol. Βρήκαν με τον τρόπο αυτό ότι η *scyllo*-inositol βελτίωσε τη συναπτική πλαστικότητα και το LTP (οι Shankar και συνεργάτες, έδειξαν *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες νευρώνων της περιοχής CA1 του ιππόκαμπου, ότι ολιγομερή του αμυλοειδούς β προκαλούν απώλεια δενδριτικών απολήξεων, μειώνοντας την ενεργοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων NMDAR, προσβάλλοντας είτε το μονοπάτι εισόδου Ca^{++} , είτε το μονοπάτι κοφιλίνης-καλσινευρίνης. Οι υποδοχείς NMDAR είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση τόσο του LTP όσο και του LTD. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η *scyllo*-inositol παρεμποδίζει τα βλαβερά αποτελέσματα των ολιγομερών Αβ.)

Οι ομοιότητες που παρουσιάζουν οι δυο νόσοι, Πάρκινσον και Αλτσχάιμερ, ως προς την παθογένειά τους (σχηματισμός πρωτεϊνικών εγκλείστων με συνέπεια τον νευροεκφυλισμό, με πιθανά παρόμοια μονοπάτια), μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι η χρήση της *scyllo*-inositol ως επικείμενης θεραπευτικής αγωγής στη νόσο Αλτσχάιμερ, ανοίγει το δρόμο για την έρευνα και την πιθανή εφαρμογή της και στη νόσο Πάρκινσον.

Εικόνα 24. Ομοιότητες νόσων Πάρκινσον και Αλτσχάιμερ. Σχηματισμός πλακών β αμυλοειδούς στη νόσο Αλτσχάιμερ και σωματίων Lewy στη νόσο Πάρκινσον. (Προσαρμογή εικόνας από Ross et Poirer, 2004)



Ήδη στα δικά μας πειράματα δείξαμε τα θετικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της σε ανασυνδυσασμένη α-συνουκλεΐνη, σε θρεπτικό υλικό που περιέχει τη φυσιολογικά εκκρινόμενη πρωτεΐνη (CM), αλλά και *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες νευρώνων. Συγκεκριμένα, στα πειράματα με την ανασυνδυσασμένη α-συνουκλεΐνη, η *scyllo*-inositol φαίνεται να εμποδίζει το σχηματισμό ολιγομερών α-συνουκλεΐνης εν τη γενέσει τους, αλλά και να διασπά ήδη σχηματισθέντα. Κατά την εφαρμογή της στο CM είναι επίσης ιδιαίτερα εμφανής η εξαφάνιση της ζώνης των ολιγομερών. Τέλος, η προσθήκη της σε κυτταρικές καλλιέργειες που επωάστηκαν με CM, έδειξε επίσης προστατευτικά αποτελέσματα ως προς την επιβίωση των κυττάρων.

Επομένως, τα αρχικά αποτελέσματα των πειραμάτων μας ως προς το ρόλο της ουσίας *scyllo*-inositol στην παρεμπόδιση της δημιουργίας, αλλά και στη διάσπαση συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης είναι αισιόδοξα. Ωστόσο, πρέπει πολλά ακόμη να γίνουν ώστε να μπορέσουμε να μιλήσουμε για ενδεχόμενη χρήση της ως θεραπευτικής αγωγής στη νόσο Πάρκινσον. Πρωταρχικός στόχος είναι να μελετηθεί σε *in vivo* σύστημα, όπως έχει ήδη γίνει στην περίπτωση της νόσου Αλτσχάιμερ. Πάντως, αυτό που πρέπει να τονισθεί στην περίπτωση της *scyllo*-inositol είναι ότι διαθέτει μια σειρά από ιδιότητες που την καθιστούν ελκυστική για τη χρήση της ως θεραπευτική αγωγή. Συγκεκριμένα, είναι μια μικρομοριακή ουσία, διαθέσιμη για *peros* χρήση, είναι διαλυτή και παρουσιάζει εξαιρετική διαπερατότητα στον ανθρώπινο εγκέφαλο, εμφανίζει τη δράση της ως παρεμποδιστή της δημιουργίας πρωτεϊνικών ολιγομερών ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις και από τις μέχρι στιγμής μελέτες *in vivo* δεν φαίνεται να παρουσιάζει τοξικές παρενέργειες (Townsend et. al., 2006).

Τέλος, υπάρχει και μια ακόμη συνισταμένη, που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψιν, ως προς τη δράση όλων αυτών των χημικών ουσιών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα πρωτοϊνίδια διαθέτουν ισχυρές νευροτοξικές ιδιότητες. Επομένως, η αναστολή της διαδικασίας σχηματισμού ινιδίων σε πρώιμα στάδια με την επακόλουθη παραγωγή μικρών ολιγομερών, μπορεί να αποβεί περισσότερο καταστροφική παρά ωφέλιμη. Επομένως, η έρευνα για ένα ιδανικό φάρμακο για τις συνουκλεϊνοπάθειες θα πρέπει να στραφεί προς την ανακάλυψη μορίων που δρουν είτε σταθεροποιώντας τη φυσιολογική μη αναδιπλούμενη δομή της α-συνουκλεΐνης ή εμποδίζοντας ολοκληρωτικά τη συσσωμάτωσή της. Η ιδιότητα αυτή έχει αποδειχτεί ότι ισχύει για την περίπτωση της *scyllo*-inositol σχετικά με τη δράση της σε χαμηλού μοριακού βάρους ολιγομερή β αμυλοειδούς (Townsend et. al., 2006). Πράγματι, στη συγκεκριμένη μελέτη, αποδεικνύεται ότι η *scyllo*-inositol, προσδένεται αλλά δεν διασπά τα συγκεκριμένα ολιγομερή, που αποτελούν τοξικές

μορφές. Αντιθέτως, τα σταθεροποιεί, αποτρέποντας τις τοξικές τους δράσεις, με άγνωστο ωστόσο μηχανισμό.

Κλείνοντας, πρέπει να επισημανθεί ότι όλες οι πρόσφατες θεραπείες στη νόσο Πάρκινσον (υποκατάσταση με ντοπαμίνη, χορήγηση αγωνιστών ντοπαμίνης, αναστολείς του ενζύμου COMPT, αναστολείς του ενζύμου MAO-B, απελευθερωτές ντοπαμίνης (πχ. αμανταδίνη), στερεοτακτικές επεμβάσεις), είναι απλά συμπτωματικές. Οι νέες θεραπείες θα πρέπει να έχουν τη δυναμική να επιβραδύνουν ή και να αναχαιτίζουν την πρόοδο της ασθένειας. Ωστόσο, για να αναπτυχθούν αποτελεσματικά θεραπευτικά πρωτόκολλα, είναι επιτακτική ανάγκη να κατανοηθεί η λεπτομερής ανάλυση της λειτουργίας, δυσλειτουργίας και του μηχανισμού δημιουργίας ολιγομερών της α-συνουκλεΐνης, να ταυτοποιηθεί το είδος των πρωτοϊνιδίων που απαντάται στον ανθρώπινο εγκέφαλο και να καθοριστεί ο ακριβής τρόπος πρόκλησης τοξικότητας.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή κύριο Λεωνίδα Στεφανή, που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο του, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, τους επιβλέποντές μου κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης έρευνας, Ευαγγελία Εμμανουηλίδου και Κώστα Βεκρέλλη, τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, καθηγητές κυρία Θερμού και κύριο Ευθυμίου, καθώς και όλο το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου που με βοήθησε ποικιλοτρόπως. Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου που με στήριξε υλικά και ηθικά σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

7. Βιβλιογραφία

1. Ahn K., Paik S., Chung K., Kim J. (2006) Amino acid sequence motifs and mechanistic features of membrane translocation of α -synuclein. *J.Neurochem.*97:265-279
2. Arima T., Drewell R.A., Oshimura M., Wake N., Surani M. A. (2000) A Novel Imprinted Gene, *HYMAI*, Is Located within an Imprinted Domain on Human Chromosome 6 Containing *ZAC*. *Genomics* 67, 248–255
3. Auluck P. K., Edwin Chan H. Y., Trojanowski J.Q., Lee Virginia M.-Y., Bonini N.M. (2002) Chaperone suppression of α -synuclein toxicity in a drosophila model for Parkinson's disease. *Science* 295: 865-868
4. Auluck P.K., Bonini N.M. (2002) Pharmacological prevention of Parkinson disease in *Drosophila*. *Nature Medicine* 8(11): 1185-1186
5. Baba M. , Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T. (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152: 879– 884
6. Barlowe, C. (2002) COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin.Cell Biol.* 4: 417–422
7. Bennett M.C. (2005) The role of α -synuclein in neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics* 105:311-331
8. Bonifati V., Rizzu P., Van Barren MJ., Schaap O., Breedveld GJ. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256-259
9. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., De Vos R.A.I., Steur E.N.H.J., Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* 24:197-211
10. Chandra S., X. Chen, J. Rizo, R. Jahn, T.C. Sudhof (2003) A broken alpha-helix in folded alpha-Synuclein. *J. Biol. Chem.* 278: 15313–15318
11. Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1167–1169.
12. Chiba-Falek O., Nussbaum R. L. (2001) Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system. *Hum Mol Genet* 10: 3101-3109

13. Clayton, D. F., George, J. M. (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 58, 120-129
14. Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., and Lansbury, P. T., Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294: 1346-1349
15. Cookson M.R. (2004) Molecules that cause or prevent Parkinson's disease. *Journal pbio.* 2:1717-1720
16. Cookson M.R. (2005) The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 29-52
17. Cooper A., Gitler A., Cashikar A., Haynes C., Hill K., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn K., Liu F., Cao S., Caldwell K., Caldwell G., Marsischky G., Kolodner R., LaBaer J., Rochet J.C., Bonini N., Lindquist S. (2006) α -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson models. *Science* 13:324-328
18. Cyr D.M., J. Hohfeld, C. Patterson (2002) Protein quality control: U-box containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem. Sci.* 27: 368- 375
19. Dauer W., Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909
20. Davidson W.S., A. Jonas, D.F. Clayton, J.M. George (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273: 9443- 9449
21. Dawson T.M., Dawson V.L. (2002) Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nature neuroscience supplement* 5:1058-1061
22. El-Agnaf O.M.A., Paleologou K.E., Greer B., Abogrein A.M., King J.E., Salem S.A., Fullwood N.J., Benson F.E., Hewitt R., Ford K.J., Martin F.L., Harriott P., Cookson M.R., Allsop D. (2004) A strategy for designing inhibitors of α -synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson disease and related disorders. *The FASEB Journal* 10.1096/fj.03-1346fje
23. El-Agnaf O.M.A., Salem S.A., Paleologou K.E., Cooper L.J., Fullwood N.J., Gibson M.J., Curran M.D., Court J.A., Mann D.M.A., Ikeda S.I., Cookson M.R., Hardy J., Allsop D. (2003) α -synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *The FASEB Journal* 10.1096/fj.03-0098fje.

24. Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K.(2008) Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of Aging*
25. Farrer M., Maraganore D.M., Lockhart P., Singleton A., Lesnick TG., De Andrade M., West A., De Silva R., Hardy J., Hernandez D. (2001) alpha-synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1847-1851
26. Fenili D., Rappaport R., McLaurin J.A. (2007) Properties of *scyllo*-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J.Mol.Med.* 85:603-611
27. Frid P., Anisimov S.V., Popovic N. (2007) Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* 53:135-160
28. Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Gourbali V, Aggelakis K, Scarmeas N, Papadimitriou A, Singleton A. (2006) Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Mov. Disord.* 21(4): 534-9
29. Hashimoto, M., Yoshimoto, M., Sisk, A., Hsu, L. J., Sundsmo, M., Kittel, A., Saitoh, T., Miller, A., Masliah, E. (1997) NACP, a synaptic protein involved in Alzheimer's disease, is differentially regulated during megakaryocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 611-616
30. Hegde M.L., Rao K.S.J. (2003) Challenges and complexities of α -synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 418:169-178
31. Heiser V., E. Scherzinger, A. Boeddrich, E. Nordhoff, R. Lurz, N.Schugardt, H. Lehrach, E.E. Wanker. (2000) Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6739-6744
32. Hoyer W., T. Antony, D. Cherny, G. Heim, T.M. Jovin, V.Subramaniam (2002) Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* 322: 383-393
33. Hurtig H. I., Trojanowski, J. Q. Galvin, J., Ewbank D., Schmidt M. L., Lee, V. M. et al. (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54: 1916- 1921
34. Ishii K., Klunk W.E., Arawaka S., Debnath M.L., Furiya Y., Sahara N., Shoji S.I., Tamaoka A., Pettegrew J.W., Mori H. (2002) Chrysamine G and

- its derivative reduce amyloid β -induced neurotoxicity in mice. *Neuroscience Letters* 333:5-8
35. Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H. A. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467- 475.
 36. Jakes R., Spillantini M. G., Goedert M. (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345: 27- 32
 37. Kahle P.J., M. Neumann, L. Ozmen, V. Muller, H. Jacobsen, A.Schindzielorz, M. Okochi, U. Leimer, P.H. van Der, A. Probst, E.Kremmer, H.A. Kretschmar, C. Haass (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* 20: 6365- 6373
 38. Kahle P.J., M. Neumann, L. Ozmen, V. Muller, H. Jacobsen, W.Spooren, B. Fuss, B. Mallon, W.B. Macklin, H. Fujiwara, M.Hasegawa, T. Iwatsubo, H.A. Kretschmar, C. Haass. (2002) Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse Oligodendrocytes. *EMBO Rep.* 3: 583- 588
 39. Kang J., Han K. (2001) The amide derivatives of Chrysamine G bind to the β -amyloid fibril. *Bull Korean Chem. Soc.* 22:1065-1066
 40. Kaye R., E. Head, J.L. Thompson, T.M. McIntire, S.C. Milton, C.W. Cotman, C.G. Glabe (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486- 489
 41. Keck S., R. Nitsch, T. Grune, O. Ullrich (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 85: 115-122
 42. Kim Y.S., Joh T.H. (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease *Experimental and Molecular Medicine* 38:333-347
 43. Kim Y.S., Randolph T.W., Manning M.C., Stevens F.J., Carpenter J.F. (2003) Congo red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation. *The journal of biological chemistry* 278:10842-10850
 44. King C.T., Deyrup L.D., Dodson S.E., Galvin K.E., Garcea M., Spector A. (2003) Effects of gustatory nerve transection and regeneration on quinine-stimulated Fos-like immunoreactivity in the parabrachial nucleus of the rat. *The Journal of comparative neurology* 465: 296-308

45. Kitada T., Asawakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608
46. Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106-108
47. Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J., Simon M., Nowak R.J., Walz T., Lansbury Jr P.T. (2002) α -synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J.Mol.Biol.* 322:1089-1102
48. Lee H.J., Patel S., Lee S.J. (2005) Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates. *The journal of Neuroscience* 25:6016-6024
49. Lee H.J., Suk J-E., Bae E-J., Lee J-H., Paik S.R., Lee S-J. (2008) Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*
50. Lee P.H., Lee G., Park H.J., Bang O.Y., Joo I.S., Huh K. (2006) The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J.Neural Transm* 113:1435-1439
51. Lee S-J. (2008) Origins and effects of extracellular α -synuclein: implication in Parkinson's disease. *J.Mol.Neuroscience* 34:17-22
52. Lin W.L., M.W. DeLucia, D.W. Dickson (2004) Alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 354: 99-102
53. Lincoln S., Wiley J., Lynch T., Langston J.W., Chen R., Lang A., Rogaeva E., Sa DS., Munhoz RP., Harris J. (2003) Parkin-proven disease: common founders but divergent phenotypes. *Neurology* 48: 1583-1588
54. Lindersson E., P. Hbjrup, W. Gai, D. Locker, D. Martin, P.H. Jensen (2004) Alpha-synuclein filaments bind the transcriptional regulator HMGB-1, *Manus (submitted for publication)*
55. Lindersson E., P.H. Jensen Alpha-synuclein binding proteins, in: P.J. Kahle, C. Haass (Eds.), *Molecular Mechanisms of Parkinson's Disease, Landes Bioscience* pp. 1- 12
56. Lindersson E., R. Beedholm, P. Hojrup, T. Moos, W. Gai, K.B. Hendil, P.H. Jensen (2004) Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers, *J. Biol. Chem.* 279: 12924- 12934

57. Lundvig D., Lindersson E., Jensen P.H. (2005) Pathogenic effects of α -synuclein aggregation. *Molecular Brain Research* 134:3-17
58. Manning-Bog A.B., A.L. McCormack, J. Li, V.N. Uversky, A.L.Fink, D.A. Di Monte (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 277: 1641- 1644
59. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C. (2006) Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296(6): 661-70
60. Masliah E., E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, Y. Sagara, A. Sisk, L. Mucke (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265- 1269
61. Masliah E., Iwai A., Mallory M., Ueda K., Saitoh T. (1996). Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148: 201-210
62. Masuda M., Suzuki N., Taniguchi S., Oikawa S., Nonaka T., Iwatsubo T., Hisanaga S-i., Goedert M., Hasegawa M. (2006) Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45:6085-6094
63. McLaurin J., Barakat M.E., Brown M.E., Hawkes C.E., Lambermon M.H.L., Phinney A.L., Darabie A.A., Cousins J.E., French J.E., Lan M.F., Chen F., Wong S.F.F.N., Mount H.T.J., Fraser P.E., Westaway D.E. and St George-Hyslop P. (2006) Cyclohexanehexol-based inhibitors of Ab-aggregation prevent and reverse Alzheimer-like features in a transgenic model of Alzheimer Disease. *Nature Medicine* 12:801-808
64. McLaurin J.A., Golomb R., Jurewicz A., Antel J.P., Fraser P.E. (2000) Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid β peptide and inhibit A β -induced toxicity. *The journal of Biological Chemistry* 275:18495-18502
65. McNaught K.S., P. Jenner (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297: 191- 194

66. McNaught K.S., R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner, C.W. Olanow (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease, *Exp.Neurol.* 179: 38–46
67. Mizuno Y., Hattori N., Mori H., Suzuki T., Tanaka K. (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 14: 477-482
68. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. (2006) Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 15(7): 1151-8
69. Molecular cloning: A laboratory manual, Tom Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory 1982
70. Mori, F., Tanji, K., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2002) Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Exp Neurol* 176: 98-104
71. Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wullner U, Meitinger T, Gasser T. (2005) Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 57(4): 535-41
72. Murray I.V., B.I. Giasson, S.M. Quinn, V. Koppaka, P.H. Axelsen, H.Ischiropoulos, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation *in vitro*, *Biochemistry* 42: 8530– 8540
73. Narayanan, V., and Scarlata, S. (2001) Membrane binding and self-association of α -synucleins. *Biochemistry* 40: 9927–9934
74. Narhi L., S.J. Wood, S. Steavenson, Y. Jiang, G.M. Wu, D. Anafi, S.A. Kaufman, F. Martin, K. Sitney, P. Denis, J.C. Louis, J. Wypych, A.L. Biere, M. Citron, (1999) Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation, *J. Biol. Chem.* 274: 9843– 9846
75. Nickel, W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. *Eur. J. Biochem.* 270: 2109–2119
76. Nishimura, N., Plutner, H., Hahn, K., and Balch, W. E. (2002) The delta subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6755–6760
77. Norris E.H., Giasson B.I., Hodara R., Xu S., Trojanowski J.Q., Ischiropoulos H., Lee V.M.-Y. (2005) Reversible inhibition of alpha-

- synuclein fibrillization by dopaminochrome mediated conformational alterations. *J. Biol. Chem.* 280: 212–21219.
78. Nussbaum R.L., Ellis C.E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med* 348:1356-1364
79. Nussbaum RL, Ellis CE. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348: 1356-64
80. Paik S.R., H.J. Shin, J.H. Lee, C.S. Chang, J. Kim, (1999) Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein, *Biochem. J.* 340: (Pt 3) 821– 828
81. Paik S.R., J.H. Lee, D.H. Kim, C.S. Chang, J. Kim, (1997) Aluminum induced structural alterations of the precursor of the non-A betacomponent of Alzheimer's disease amyloid, *Arch. Biochem. Biophys.* 344: 325– 334
82. Papp M.I., J.E. Kahn, P.L. Lantos, (1989) Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome), *J. Neurol. Sci.* 94: 79– 100
83. Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, H. O., Rhim, H., Paik, S. R., Chung, K. C., Park, J. H., Kim, J. (2002) Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca⁺²-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood* 100: 2506-2514
84. Perrin R.J., W.S. Woods, D.F. Clayton, J.M. George, (2001) Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins, *J. Biol. Chem.* 276: 41958–41962
85. Petersen K., Olesen O. F., Mikkelsen J. D. (1999) Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91: 651– 659
86. Petrucelli L., O'Farrel C., Lockhart PJ., Baptista M., Kehoe K. (2002) Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: Proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36: 1007-1019
87. Pirkkala L., T.P. Alastalo, X. Zuo, I.J. Benjamin, L. Sistonen, (2000) Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway, *Mol. Cell. Biol.* 20: 2670–2675
88. Polymeropoulos M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum,

- (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276: 2045–2047
89. Polymeropoulos M.H., Lavedant C., Leroy E., Ide S., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.J., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
90. Pountney D.L., R. Lowe, M. Quilty, J.C. Vickers, N.H. Voelcker, W.P. Gai, (2004) Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions, *J. Neurochem.* 90: 502– 512
91. Principles of Neurology, Adams and Victor's, 7th edition, McGraw-Hill 2001
92. Recchia A., Debetto P., Negro A., Guidolin D., Skaper S.D., Giusti P. (2004) α -synuclein and Parkinson's disease. *The FASEB Journal* 18:617-626
93. Ross C.A., Poirier M.A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10:S10-S17
94. Saito Y., A. Kawashima, N.N. Ruberu, H. Fujiwara, S. Koyama, M. Sawabe, T. Arai, H. Nagura, H. Yamanouchi, M. Hasegawa, T. Iwatsubo, S. Murayama, (2003) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62: 644– 654
95. Scherzer CR., Feany MB. (2004) Yeast genetics targets lipids in Parkinson's disease. *Trends Genet* 20: 273-7
96. Serpell L.C., J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, R.A. Crowther, (2000) Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 4897– 4902
97. Shankar Ganesh M., Brenda L. Bloodgood, Matthew Townsend, Dominic M. Walsh, Dennis J. Selkoe and Bernardo L. Sabatini (2007) Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Neuroscience*:27(11):2866 –2875
98. Sharon R., I. Bar-Joseph, M.P. Frosch, D.M. Walsh, J.A. Hamilton, D.J. Selkoe (2003) The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease, *Neuron* 37: 583–595
99. Sharon, R., Goldberg, M. S., Bar-Josef, I., Betensky, R. A., Shen, J., and Selkoe, D. J. (2001) α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight

- complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9110–9115
100. Shendelman S., Joonason A., Martinat C., Leete T., Abeliovich A. (2004) DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits α -synuclein aggregation formation. *Plos Biol* 2: e362
101. Shtilerman M.D., T.T. Ding, P.T. Lansbury Jr. (2002) Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* 41: 3855–3860
102. Singleton A., K. Gwinn-Hardy, Y. Sharabi, S.T. Li, C. Holmes, R. Dendi, J. Hardy, A. Singleton, A. Crawley, D.S. Goldstein (2004) Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication, *Brain* 127: 768–772
103. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R. (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841
104. Sirover M.A., (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Acta* 1432: 159–184
105. Snyder H., K. Mensah, C. Theisler, J. Lee, A. Matouschek, B. Wolozin (2003) Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function, *J. Biol. Chem.* 278: 11753–11759.
106. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 6469-6473
107. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840
- Sun Yedi, Guohua Zhang, Cheryl A. Hawkes, James E. Shaw, JoAnne McLaurin and Mark Nitz (2008) Synthesis of scyllo-inositol derivatives and their effects on amyloid beta peptide aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (15):7177-7184
108. Sung J.Y., Park S.M., Lee C.H., Um J.W., Lee H.J., Kim J., Oh Y.J., Lee S-T., Paik S.R., Chung K.C. (2005) Proteolytic cleavage of extracellular secreted α -synuclein via matrix metalloproteinases. *The journal of biological chemistry* 280:25216-25224

109. Takahiro A., Robert A. D., Mitsuo O., Norio W., M. Azim S. (2000) A Novel Imprinted Gene, *HYMAI*, Is Located within an Imprinted Domain on Human Chromosome 6 Containing *ZAC*. *Genomics* 67: 248–255
110. Townsend Matthew, James P. Cleary, Tapan Mehta, Jacki Hofmeister, Sylvain Lesne, Eugene O’Hare, Dominic M. Walsh and Dennis J. Selkoe (2006) Orally Available Compound Prevents Deficits in Memory Caused by the Alzheimer Amyloid- β Oligomers. *Ann Neurol* 60:668–676
111. Uversky V.N. (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry* 103:17-37
112. Valente EM., Abou-Sleiman PM, Caputo V., Muqit MM, Harvey K. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK-1*. *Science* 304: 1158-1160
113. Vekrellis K., Rideout H., Stefanis L. (2004) Neurobiology of α -synuclein. *Molecular Neurobiology* 30:1-13
114. Vogiatzi T., Xilouri M., Vekrellis K., Stefanis L. (2008) Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 283(35):23542-56
115. Walsh Dominic M. and Dennis J. Selkoe (2007) Ab Oligomers – a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry* 101:1172–1184
116. Wang J., Xu G., Gonzales V., Coonfield M., Fromholt D., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. (2002) Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with disrupted copper-binding site. *Neurobiology of disease* 10: 128-138
117. White M. (2007) α -synuclein and the case of the blocked ER-Golgi pathway. *Eukarion* 3:27-28
118. Wong K., Sidransky E., Verma A. (2004) Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 82: 192-207
119. Zarranz J, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Ates B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 55(2):164-73
120. Zhang W., Wang T., Pei Z., Miller D.S., Wu X., Block M.L., Wilson B., Zhang W., Zhou Y., Hong J-S., Zhang J. (2005) Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson’s disease. *The FASEB Journal* 19:533-542
121. Νευρολογία Mumenthaler, 1^η έκδοση, Παρισιάνου 2006

122. Νευρολογία Λογοθέτη 4^η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη
2004